



**Aalto-universitetet  
Högskolan för  
kemiteknik**

**Högskolan för kemiteknik  
Utbildningsprogrammet för kemisk teknik**

**Stella Wahlström**

**FOSFORFRIGÖRELSE UR ÅKERJORD SOM FÖLJD AV  
MIKROBIOLOGISK JÄRN- OCH SULFATREDUKTION**

**Diplomarbete som inlämnats för granskning som lärdomsprov för avläggande  
av diplomingenjörsexamen, Esbo den 10.4.2014.**

**Övervakare**

**Professor Katrina Nordström**

**Handledare**

**Docent Petri Ekholm**

**Docent Jouni Lehtoranta**

---

**Författare** Stella Wahlström

---

**Titel** Fosforfrigörelse ur åkerjord som följd av mikrobiologisk järn- och sulfatreduktion

---

**Institution** Högskolan för kemiteknik

---

**Professur** Tillämpad mikrobiologi

---

**Kod för professuren** KE-30

---

**Övervakare** Professor Katrina Nordström

---

**Handledare / Granskare** Docent Petri Ekholm och docent Jouni Lehtoranta

---

**Datum** 10.04.2014

---

**Sidantal** 77 s. + bilagor  
(11 s.)

---

**Språk** Svenska

---

### Sammandrag

I Finland står jordbruken för över hälften av den antropogena fosforbelastningen till Östersjön, varav största delen är i form av partikulärt fosfor (P). Hittills har man uppskattat det potentiellt biotillgängliga P med algtester och kemiska extraktioner. Det är dock oklart hur mycket P som frigörs när partiklarna hamnar på havsbotten där sulfidhaltiga och anaeroba förhållanden råder. Fosforfrigörelse ur åkerjord som följd av mikrobiologisk järn- och sulfatreduktion undersöktes i två långvariga experiment, med vilka de reducerande förhållandena i bottensediment simulerades. Mängden åkerjord och acetat varierades. Åkerjorden tjänade som P- och Fe-källa och acetatet som kolkälla (C) för mikrobmetabolismen, medan sulfat ( $\text{SO}_4$ ) fanns bland andra brackvattenjoner i provlösningen. Proverna inokulerades med bottensediment och inkuberades i över två år i mörker. Upp till 0,65 mg P per g jord (44 % av det totala P) frigjordes under inkubationen, vilket överskred mängden P extraherad med buffrad ditionit och NaOH (0,21 mg/g respektive 0,57 mg/g). Resultaten antyder att dessa kemiska extraktionsmetoder underskattar det potentiellt tillgängliga P. En regressionsanalys visade att P-frigörelsen berodde på både åkerjord- och C-mängden. Utan C frigjordes bara 25 % av den mängd P som frigjordes med C-tillsats. Även  $\text{SO}_4$ -minskningen berodde på C, vilket antyder mikrobiologisk  $\text{SO}_4$ -reduktion med resulterande vätesulfidbildning. Acetat minskade löst järn (Fe), vilket vidare tyder på Fe-sulfidutfällning. Denna utfällning är en sannolik förklaring till den omfattande P-frigörelsen: Fe kan inte i sulfidform binda P. Det verkar finnas ett gränsvärde för C över vilket P-frigörelsen kan förutspås enbart på basen av jordmängden. Denna metod lämpar sig för att bestämma hur mycket P som kan frigöras från eroderade jordpartiklar efter att de sjunkit till botten av en eutrofierad vattenmassa, som t ex Finska viken.

---

**Nyckelord** eutrofiering, övergödning, fosforförluster, erosion, jordbruk, dissimilatorisk sulfatreduktion, dissimilatorisk järnreduktion, anaeroba mikrober, bottensediment, syrebrist, sulphate-mediated eutrophication

---

---

**Author** Stella Wahlström

---

**Title of thesis** Phosphorus release from agricultural soil due to microbial iron and sulphate reduction

---

**Department** School of Chemical Technology

---

**Professorship** Applied microbiology**Code of professorship** KE-30

---

**Thesis supervisor** Professor Katrina Nordström

---

**Thesis advisor(s) / Thesis examiner(s)** Docent Petri Ekholm and Docent Jouni Lehtoranta

---

**Date** 10.04.2014**Number of pages** 77 p.  
+ appendices (11 p.)**Language** Swedish

---

**Abstract**

In Finland more than half of the anthropogenic phosphorus (P) loading to the Baltic Sea originates from agriculture, and the larger part of the loading is in particulate form. Until now the potentially bioavailable P has been evaluated by algal assays and chemical extractions. However, it is unknown how much P is released after the particles have settled on the sea floor, where sulphidic and anaerobic conditions prevail. Phosphorus release from agricultural soil due to microbiological iron (Fe) and sulphate (SO<sub>4</sub>) reduction was investigated in two experiments, in which the reducing conditions of bottom sediments were simulated. The amounts of soil and acetate were varied, the soil serving as a P and Fe source, and acetate as a carbon (C) source for the microbial metabolism. Sulphate was present among other brackish water ions in the test solution. The test flasks were inoculated with bottom sediment and incubated for over two years in the dark. Up to 0.65 mg P per one gram of soil (44% of the total P) was released during the incubation, which exceeded the amount of P extracted by buffered dithionite and NaOH (0.21 mg/g and 0.57 mg/g, respectively). The results imply that these chemical extractions underestimate the potentially available P. A regression analysis showed that the P release depended on the amount of both soil and C. Without C, the release of P was only 25% of the amount that was released with added C. The decrease of SO<sub>4</sub> also depended on C, indicating microbiological SO<sub>4</sub> reduction with subsequent hydrogen sulphide formation. Acetate decreased dissolved Fe, which further indicates precipitation of Fe sulphides. This precipitation is a probable explanation for the strong P release: Fe in sulphide form cannot bind P. There appears to be a threshold value for C, over which the P release can be predicted solely by the amount of soil. This method is suitable for evaluating how much P can be released from eroded soil particles after they end up in bottom sediment of a eutrophic water body, such as the Gulf of Finland.

---

**Keywords** eutrophication, phosphorus losses, erosion, agriculture, dissimilatory sulphate reduction, dissimilatory iron reduction, anaerobic microbes, bottom sediment, oxygen depletion, sulphate-mediated eutrophication

---

## Förord

I diplomarbetet användes data från två laboratorieexperiment utförda vid Finlands miljöcentral respektive Helsingfors universitet. Vätesulfidanalysen utfördes i Novalab Ab och SO<sub>4</sub>-analysen i Finlands miljöcentrals miljömättnings- och testningslaboratorium i Uleåborg.

Föreningen Maa- ja vesitekniikan tuki rf stödde diplomarbetet med ett stipendium.

Agroforstdoktor Risto Uusitalo vid MTT har bidragit med information och sakkunskap gällande experimentet på Finlands miljöcentrals laboratorium i Håkansåker. Akademiforskare Petra Tallberg vid Helsingfors universitet har delgivit resultaten med kompletterande information från experimentet på Helsingfors universitets laboratorium i Vik.

Professor Katrina Nordström övervakade arbetet, och teknologie doktor Elina Kähkönen deltog i handledningen i början av arbetet. Tack till båda för pålitlig och värdefull feedback, även på kort varsel.

Docent Petri Ekholm och docent Jouni Lehtoranta på Finlands miljöcentral har fungerat som handledare. Ett varmt tack riktas till handledarna för grundlig introduktion till ämnet, detaljerad feedback och givande möten.

## Förteckning över använda förkortningar

AER	<i>Anion Exchange Resin</i> , anjonutbytesharts
BD-P	<i>Bicarbonate-Dithionite (extractable) Phosphorus</i> , bikarbonat-ditionitextraherbart fosfor
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i> , biokemisk syreförbrukning
DOC	<i>Dissolved Organic Carbon</i> , löst organiskt kol
DCAA	<i>Dual Culture Algal Assay</i> , algtest med två kammare
HELCOM	<i>Baltic Marine Environment Protection Commission - Helsinki Commission</i> , konventionen om skydd av Östersjöområdets marina miljö - Helsingforskommissionen
ICP-OES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy</i> , optisk emissionsspektroskopi med induktivt kopplad plasma

## Användning av kemiska beteckningar i texten

*P* används som allmän beteckning för fosfor i alla former.

*PO<sub>4</sub>* används som beteckning för ortofosfat i alla dissociationsstadier, varav  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  och  $\text{HPO}_4^{2-}$  dominerar i lösningar med pH 7–9.

*SO<sub>4</sub>* används som beteckning för sulfat i alla dissociationsstadier, varav  $\text{SO}_4^{2-}$  dominerar i lösningar med pH > 2.

*H<sub>2</sub>S* används som beteckning för vätesulfid, även om den dominerande lösta formen i pH 7~13 är  $\text{HS}^-$ .

*Fe-oxider* betecknar alla järn(oxyhydr)oxider, *Fe-sulfider* innefattar FeS och FeS<sub>2</sub>.

*C* används för att beteckna acetat ( $\text{CH}_3\text{CO}_2^-$ ) i de fall acetat behandlas som en allmän kolkälla för mikroberna.

## Innehållsförteckning

1	INLEDNING .....	1
2	TEORI.....	3
2.1	Eutrofierande fosfor .....	3
2.2	Mikrobiologisk verksamhet i bottensediment.....	11
2.3	Järn- och sulfatreduktion – dominerande anaeroba processer i bottensediment	17
2.4	Arbetets syfte .....	26
3	MATERIAL OCH METODER .....	27
3.1	Provförberedning .....	27
3.2	Inkubation .....	32
3.3	Provtagning.....	32
3.4	Analysmetoder .....	33
3.5	Statistiska metoder.....	38
4	RESULTAT .....	41
4.1	Fosforfrigörelsen.....	41
4.2	Sulfatminskning .....	43
4.3	Minskning av löst järn .....	45
4.4	Förändring av pH .....	47
4.5	Förklaring till fosforfrigörelsen .....	48

5	DISKUSSION.....	53
5.1	Mikrobiella processer ökar fosforfrigörelsen .....	53
5.2	Mikrobiellt frigörbar fosfor .....	55
5.3	Järnreduktion inhiberar inte sulfatreduktion.....	56
5.4	Fe/P-kvotens samband med fosforfrigörelsen .....	57
5.5	Praktiska förslag på förbättring av experimentet .....	58
6	SLUTSATSER.....	59
6.1	Förslag till fortsatt forskning .....	60
7	KÄLLFÖRTECKNING.....	61
	Bilaga 1.....	I
	Bilaga 2.....	VIII

## 1 Inledning

Östersjön är ett känsligt och sårbart hav. Vattenmassan är en blandning av sötvatten från tillrinningsområdet och havsvatten från Nordsjön. Geologiskt sett är Östersjön ett ungt hav, varför endast ett fåtal organismer har hunnit anpassa sig till det bräckta vattnet.

Ett av de största miljöproblemen som drabbat Östersjön är eutrofiering. Eutrofiering innebär att primärproduktionen ökar som följd av intensifierad näringsbelastning och leder till ökad primärproduktion med förändrad artsammansättning och ökad grumlighet som följd. Nedbrytningen av den ökade mängden biomassa förbrukar allt större mängder syre. Långvarig syrebrist har fatala följder för vattenlevande organismer. Som en följd av eutrofieringen är delar av Östersjöns havsbotten nu permanent syrefria.

De näringsämnen som reglerar tillväxten i vattenmiljöer är i allmänhet fosfor (P) och kväve (N). I sötvatten och i delar av Östersjön är P det tillväxtreglerande näringsämnet. Efter andra världskriget ökade den artificiella gödslingen med P och N kraftigt, vilket i Finland fram till 90-talet hade resulterat i en 30 % ökning av ytjordens P-halt (Rekolainen 1993; Saarela 1991). I och med den kraftigt effektiviserade reningen av samhällsavloppsvatten står jordbruken numera för ca 60 % av Finlands antropogena P-belastning till Östersjön (Uusitalo *et al.* 2007). Även om P-utsläppen har minskat har varken P-halterna eller eutrofieringen lindrats, vilket beror på att P fortfarande frigörs kontinuerligt ur sedimenten (Pitkänen *et al.* 2001).

Fosfor transporteras från jordbruksmarker genom ytavrinning och dränering. Dels förekommer P i löst form med omedelbar eutrofierande verkan, dels är den bunden till lera, till oxider, hydroxider och oxyhydroxider av aluminium och järn (härefter Al- och Fe-oxider) samt till växtrester och humus. Södra Finlands P-belastning består till största delen av partikelbundet P och till en mindre del av löst P (Uusitalo 2004), och de leriga jordarna i södra Finland är speciellt benägna till erosion (Uusitalo *et al.* 2007).



Väl ute i sjö och hav sedimenterar partiklarna till botten där de kan frigöra P på lång sikt genom kemiska, fysikaliska och mikrobiologiska processer. Förhållandena i sedimenten är avgörande för om retenteras eller mobiliseras. Syrebristen är inte bara ett symptom på eutrofiering, utan också en faktor som kan accelerera själva eutrofieringen. När syre uttömts börjar mikroberna oxidera det organiska materialet med andra reduktionsbenägna ämnen såsom  $\text{NO}_3$ ,  $\text{Mn(IV)}$ ,  $\text{Fe(III)}$  och  $\text{SO}_4$ .

Eftersom P ofta är bundet till Fe-oxider, resulterar järnreduktion i P-frigörelse (Einsele 1936), men för att P-frigörelsen ska vara omfattande och verka på lång sikt krävs sulfatreduktion med Fe-sulfidbildning (Roden & Edmonds 1997). Sulfatreduktionen i sedimenten har därigenom en indirekt eutrofierande verkan.

Sulfat ( $\text{SO}_4$ ) förekommer naturligt i brack- och havsvatten, men mänsklig verksamhet ökar mängden  $\text{SO}_4$  i miljön. Av den producerade svavelsyran ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) används över hälften för produktion av gödsel. Sulfat hamnar också i vattendragen genom gruvdrift, marin transport, avloppsvatten och som nedfall. Svavelutsläppen ökade i och med den industriella revolutionen på 1800-talet, vilket nu kan observeras som en ökad ansamling av Fe-sulfider ( $\text{FeS}$  och  $\text{FeS}_2$ ) i sedimenten (Thomsen *et al.* 2004).

Den totala P-halten är relativt lätt att analysera. HELCOM kräver bara siffror på den totala P-belastningen från Östersjöländerna. Totalfosfor i sig är dock en svag mätare på belastningens eutrofierande verkan, eftersom bara en del av den totala P är tillgängligt för alger. Ur eutrofieringssynvinkel är den potentiellt biotillgängliga P därför mera intressant. För att uppskatta biotillgängligheten har man använt sig av biologiska metoder såsom algtester (Ekholm 1998; Ekholm *et al.* 2009) samt kemiska metoder såsom anjonbytesharts (AER) och bikarbonat-ditionitextraktion (BD) (Uusitalo *et al.* 2003). De två förstnämnda metoderna antas beskriva P-frigörelse i syrehaltiga miljöer, medan den sistnämnda metoden simulerar extremt reducerande förhållanden i botten sediment utan återoxidering av Fe (Uusitalo 2004). Det är dock osäkert hur realistisk bild de kemiska metoderna kan ge av P-frigörelsen. De experiment som genomförts inom detta diplomarbete tar ett steg närmare den verkliga miljö där erosionspartiklarna hamnar genom att använda brackvattenlösning med naturlig bakterieflora från Finska viken i en långvarig syrefri inkubering.

## 2 Teori

### 2.1 Eutrofierande fosfor

#### 2.1.1 Jordbrukens fosforutsläpp

Kontinentalskorpan består av ca 0,1 % P (Froelich *et al.* 1982). De finländska åkerjordarnas totala P-halt rör sig i samma storleksordning (beroende på jordtyp och gödslingshistoria) (Yli-Halla *et al.* 2005), varav endast en liten del är tillgängligt för växter (Williams *et al.* 1980; Yli-Halla 1990). I och med utvecklingen av syntetiska gödningsmedel har tillförseln av P till åkerjordarna ökat markant. En betydande mängd av det tillsatta P har bundits till jordens Al- och Fe-oxider i svårtillgängliga former (Hartikainen 1991).

På grund av att jordmånen i Finland är ung har den en relativt hög Fe-halt, 1,6–7,1 % av torrvikten (Sippola 1974). De unga jordarnas Fe-oxider är i kalla och fuktiga klimat oftast lågkristallint (Ekholm & Lehtoranta 2012). Lågkristallina former binder P betydligt bättre än högkristallina former (McLaughlin *et al.* 1981), och reduceras lättare av både mikrober (Roden & Zachara 1996) och H<sub>2</sub>S (Poulton *et al.* 2004).

Sydvästra Finlands tunga lerjordar<sup>1</sup> har dålig vattenledningsförmåga med vattenmättnad och häftig ytavrinning som följd (Turtola & Paajanen 1995). Riklig ytavrinning ger höga erosionshastigheter med höga förluster av både partikulärt P och löst P, varav den partikulära fraktionen dominerar (Rekolainen *et al.* 1997). Fosforförlusterna från finländska åkrar var mellan åren 1981 och 1997 ungefär 110 kg km<sup>-2</sup> år<sup>-1</sup> i totalt P och 14 kg km<sup>-2</sup> år<sup>-1</sup> i löst reaktivt P (Vuorenmaa *et al.* 2002).

---

<sup>1</sup> En lerjord består enligt definitionen av över 30 % lera. Lera definieras som partiklar med diameter under 0,002 mm (Köppä 1985) och består främst av hydrerade aluminiumsilikater (Manahan 2005, s. 119).



Figur 1 Åkererosion (det vänstra fotografiet taget av Petri Ekholm, de högra av Pasi Valkama)

#### 2.1.2 Sorption och desorption

I erosionspartiklar är P främst adsorberat på Fe-oxidytor (Compton *et al.* 2000). I finländska jord- och sjösediment är lågkristallina hydrerade Fe- och Al-oxider de viktigaste P-sorberande ämnena (Hartikainen 1979). Lågkristallina Fe(III)-oxider har tio gånger högre kapacitet att sorbera P än de högkristallina formerna götit ( $\alpha$ -FeOOH) och hematit ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (McLaughlin *et al.* 1981).

Fosfor adsorberas till Fe- och Al-oxider främst genom ligandutbytesreaktioner (Hingston *et al.* 1967). Även om sorption i allmänhet ökar med ökad jonstyrka i omgivande lösning, konkurrerar P om sorptionsställen med andra anjoner som  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{OH}^-$  och organiska anjoner (Struthers & Sieling 1950; Dalton *et al.* 1952; Froelich 1988). Av samma orsak ökar pH-höjning P-desorptionen genom förstärkt anjonutbyte med  $\text{OH}^-$  (Hingston *et al.* 1967; Hawke *et al.* 1989; Caraco *et al.* 1989; Hartikainen & Yli-Halla 1996). Även negativa korrelationer mellan pH och P-desorption har observerats (De Jonge & Villerius 1989; Roden & Edmonds 1997), vilket enligt De Jonge & Villerius (1989) kan bero på att pH-sänkning löser upp kalciumkarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) och därmed frigör  $\text{CaCO}_3$ -bundet P.

Sorptionen/desorptionen av P påverkas av utspädningsförhållandet, ju mer vatten i förhållande till jord, desto mer P desorberas (Sharpley *et al.* 1981; Yli-Halla *et al.* 1995). Det desorberbara P kan uppskattas t ex genom extraktion med anjonutbytesharts (*Anion exchange resin*, AER). Vid sidan om den snabba adsorptionen (minuter till timmar), vilken i allmänhet mäts med AER, förekommer enligt Froelich (1988) en långsam absorption (dagar till månader) av P till metalloxiders innanmäte, och en motsvarande långsam desorption.

### 2.1.3 Fosforfrigörelse från sedimenten

Bottensedimenten har antagits fungera som en buffert genom att retertera P vid höga P-koncentrationer i det omliggande vattnet, och frigöra P när koncentrationerna är låga, såsom under sommarhalvåret när primärproduktionen är som aktivast (Froelich 1988). Buffertförmågan skulle bygga främst på mer eller mindre reversibel adsorption till Fe- och Al-oxidytor. Bindningen till Fe är mer reversibel än Al-bindningen, eftersom Fe i egenskap av en redox-känslig metall påverkas av omgivande syreförhållanden (Delaney 1998).

Den klassiska modellen om P-frigörelse enligt Einsele (1936) betonar syrets betydelse för bottensedimentets förmåga att binda P. Under syrerika förhållanden förekommer Fe huvudsakligen som Fe(III)-oxider med god förmåga att binda P. Förmågan att binda P försvagas avsevärt när Fe under syrefattiga förhållanden reduceras till det lösliga  $\text{Fe}^{2+}$ . Fosfor är i sig självt inte är redox-aktivt eftersom det i naturen som gott som alltid förekommer i oxidationsstadiet +V. Genom kopplingen till Fe påverkas P:s kretslopp däremot i hög grad av rådande redox-förhållanden (Canfield *et al.* 2005, s. 419). Aerobiska förhållanden vid sediment-vattengränssnittet förhindrar således P-frigörelse till det överliggande vattnet medan syrebrist stimulerar P-frigörelse (Einsele 1936). P och Fe kan begravas, upplösas, migrera uppåt och återutfällas flera gånger per år (Sundby *et al.* 1992).

I Finland sker avrinningen från jordbruken huvudsakligen under höstregnen och snösmältningen under tidig vår eller vårvinter (Ekholm & Kallio 1996). När algproduktionen kommer i gång i april/maj har de flesta partiklar redan sedimenterat

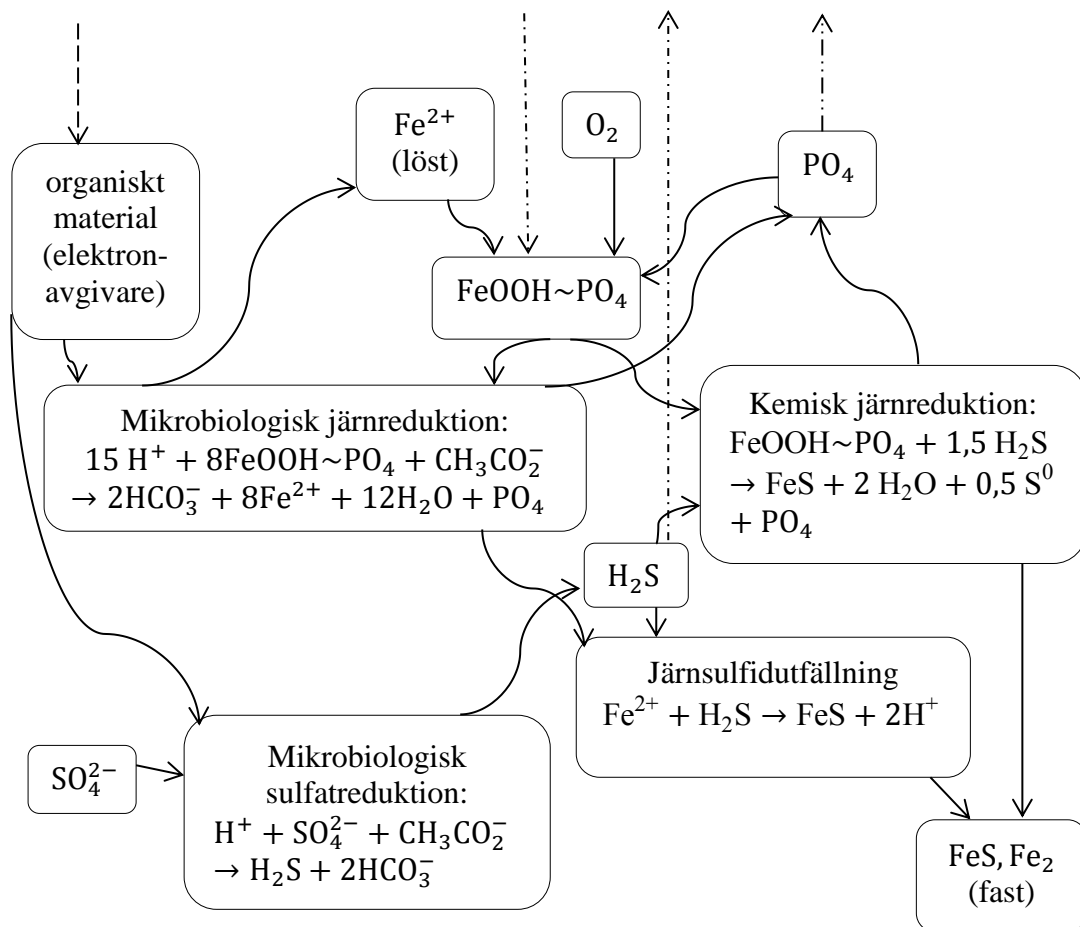
till botten, ut från det produktiva skiktet (Ekholm 1998). Under sommar och vinter uppstår en temperaturgradient som skiktat vattenmassorna och bromsar upp syretillförseln till botten, varför bottenmiljön blir reducerande. Som följd av stratifieringen och de reducerande förhållanden ackumuleras lösligt Fe(II) tillsammans med P i bottenvattnen. Först med temperaturförändringarna under vår och höst omblandas vattnet så att de undre skikten syresätts. Järnet oxideras till Fe(III)-oxider vilka åter kan fälla ut P (Einsele 1936). Det P som inte fälls ut når i och med vår- och höstomblandningen det produktiva lagret och göder vårens algblomning (Lehtoranta & Heiskanen 2003) och en eventuell sekundär algblomning på sensommaren (Rozan *et al.* 2002).

#### 2.1.4 Skillnader i P-frigörelse i sötvatten och havsvatten

Den klassiska modellen har inte visat sig vara tillräcklig för att förklara P-frigörelse (Caraco *et al.* 1991). Redan Hasler och Einsele (1948) har demonstrerat att höga  $\text{SO}_4$ -koncentrationer stimulerar P-frigörelse genom att minska tillgången på P-bindande Fe, och Sugawara *et al.* (1957) hade demonstrerat att  $\text{H}_2\text{S}$ -bildning med Fe-sulfidutfällning frigör P ur Fe-fosfater. Det kom att räkna tiotals år innan denna teori vidareutvecklades. Caraco *et al.* (1989, 1990, 1993) visade att marina och bräckta sediment frigjorde mera P än sötvattensediment, trots att det överliggande vattnet var syrehaltigt, och att P-frigörelse således inte kunde förklaras med enbart syrebrist. En delorsak till att marina och bräckta sedimenten är sämre än sötvattensediment på att reterera P kan vara att de innehåller mångfalt högre koncentrationerna anjoner såsom  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{OH}^-$  och  $\text{SO}_4^{2-}$ , vilka konkurrerar om P:s bindningsställen (Froelich 1988; Caraco *et al.* 1989; Beltman *et al.* 2000). Den mikrobiella sulfatreduktionen ökar även P-frigörelsen, dels genom att höja pH, dels genom att fälla ut Fe i Fe-sulfider (Caraco *et al.* 1989).

Så länge sedimenten innehåller mycket Fe kan de låsa betydande mängder P även om de är syrefria och reducerande (Roden & Edmonds 1997), men höga  $\text{SO}_4$ -halter ökar P-frigörelsen flerfalt (Caraco *et al.* 1990; Roden & Edmonds 1997; Katsev *et al.* 2006). Under syrefria förhållanden använder mikroorganismer bland annat Fe(III) och  $\text{SO}_4$  som oxidationsmedel. Fe(II) och  $\text{H}_2\text{S}$  bildas och fälls ut tillsammans som

fasta, praktiskt taget olösliga Fe-sulfider. Vätesulfid har också tillräckligt reduktionspotential för att reducera Fe(III) helt abiotiskt. Järnets kretslopp förvanskas och Fe begravs i form av sulfider, vilka är oförmögna att binda P (Roden & Edmonds 1997). Fosfor lösgörs från Fe och kan fritt diffundera ut i vattenpelaren och göda primärproduktionen (t ex Gächter & Müller 2003) (Figur 2). Fenomenet kallas för *sulphate-mediated eutrophication* ("sulfatförmedlad eutrofiering").



Figur 2 En schematisk illustration av P-frigörelse som följd av järn- och sulfatreduktion. Kombinationen av organiskt material och  $\text{SO}_4^{2-}$  leder till att järnet fälls ut som sulfider istället för att binda P. I reaktionslikheterna representerar acetat ( $\text{CH}_3\text{CO}_2^-$ ) det organiska materialet och FeOOH alla sorters Fe-(oxyhydr)oxider.

Kombinationen av låga Fe-halter och höga  $\text{SO}_4$ -halter kan vara en orsak till att P sällan begränsar primärproduktionen i havsvatten, men ofta är tillväxtreglerande i sötvatten där förhållandet mellan Fe och  $\text{SO}_4$  är högre (Caraco *et al.* 1990; Gunnars & Blomqvist 1997). För utfällning av Fe-fosfater krävs Fe/P-kvoter på minst 2, vilka sällan uppnås i marina sediment (Gunnars *et al.* 2002). De ökade svavel-föreningarna som industrialiseringen medfört kan ha halverat Fe/P-kvoterna i sjöars bottenvatten (Caraco *et al.* 1993). Efter 90-talet har svavelnedfallen dock minskat betydligt.

#### 2.1.5 Fosforkarakterisering

Eftersom P är en livsnödvändig komponent för alla levande organismer finns organiskt P bundet till både labilt och svårnedbrytbart material med biologiskt ursprung, i löslig och olöslig form. Oorganiskt P förekommer i löst form, adsorberat till eller inneslutet i Fe- och Mn-oxider, lera och Al-oxider, samt bundet till kalcium (Ca) såsom i apatit ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F}, \text{Cl}, \text{OH})$ ) och  $\text{CaCO}_3$  (Manahan 2005, s. 125). Även Fe-fosfater såsom vivianit ( $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$ ) och strengit ( $\text{FePO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) är allmänt förekommande i naturen och den akvatiska miljön (Hyacinthe & Van Cappellen 2004). Fe och Mn är redox-känsliga, varför P bundet till dessa metaller är reaktivt vid förändrade redox-förhållanden. P bundet till redox-okänsliga metaller som Al, Ca och Si är däremot stabilt mot redoxförändringar.

Vid karakteriseringen av P använder man sig ofta av sekventiell extraktion (Tabell 1). Med hjälp av extraktionen kan man skilja på lätt adsorberat P, P bundet till reducerbara metalloxider (främst Fe) och icke-reducerbara metalloxider (främst Al), Ca-bundet P, samt organiskt bundet P. Materia mindre än  $0,45 \mu\text{m}$  definieras operationellt som löst, medan större materia ses som partikulärt, vilket innebär att små olösliga P-innehållande partiklar och kolloider ofta hamnar i den ”lösta” fraktionen (Broberg och Persson 1988).

Tabell 1 Fosforfraktioner (Ruttenberg 1992; Lukkari *et al.* 2008).

Fraktion	
Reaktiv P	<p>löst och desorberbart P</p> <p>P bundet i reducerbara metalloxider, främst Fe</p> <p>labilt organisk P</p>
Immobil P	<p>P bundet i icke-reducerbara metalloxider, främst Al</p> <p>Ca-bundet P, främst apatit</p> <p>svårnedbrytbar organiskt material</p>

#### 2.1.6 Fosfors algtillgänglighet

För att uppskatta den eutrofierande P-belastningen behöver man precisera mängden algtillgängligt P, vilken inte kan slutledas direkt ur den totala P-mängden (Ekholm 1998). I allmänhet är löst ortofosfat ( $\text{PO}_4$ ) är den enda omedelbart algtillgängliga formen av P. I mängden eutrofierande P ingår dock även den del av det partikulära P som frigörs som  $\text{PO}_4$  över ett större tidsspann (Boström *et al.* 1988). Det potentiellt algtillgängliga P består främst av oorganisk icke-apatit-P (Williams *et al.* 1980), men alger kan också lösa upp  $\text{PO}_4$  från organiska föreningar genom enzymatisk hydrolys (Newman & Reddy 1992).

För att uppskatta det potentiellt algtillgängliga P har man använt extraktion med AER och algtester. Vid algtest inkuberas alger med partikelbunden P som enda P-källa. Metodiken varierar vida. Vissa tester använder sig av en enkel kammare där alger tillåts blanda sig med partiklarna (Berge & Källqvist 1990; Persson, 1990), medan alger i ”dubbelkammartestet” avskiljs från provet med ett membran (*Dual culture algal assay*, DCAA) (Ekholm 1994).



Analyserat med DCAA var omkring 20 % av P i finländsk åkerjord algtillgängligt. I åvatten i vilka PP bestod av främst eroderade jordpartiklar hade P-tillgängligheten sjunkit till 4 %, vilket tyder på att en stor del P redan frigjorts på vägen till åarna. Med dessa siffror som utgångspunkt uppskattades 28 % av den diffusa totala P-belastningen från jordbruken vara potentiellt tillgänglig för alger (Ekholm 1998). DCAA undervärderar antagligen det ultimata algtillgängliga P (Ekholm & Krogerus 2003), medan AER har gett ännu lägre värden (Uusitalo & Ekholm 2003). Genom en kombination av resultat från algtester och AER beräknas 16 % av det partikulära P i åkeravrinning från finländska åkrar vara tillgängligt för alger (t ex Iho och Laukkanen 2012; Laukkanen och Nauges baserat på Uusitalo 2004; Uusitalo och Ekholm 2003). Bikarbonat-ditionitextraktion ger betydligt högre utbyte: 34–58 %, av det partikelbundna P i åkeravrinning extraherades med metoden, medan AER-extraktion desorberade endast 6–10 % av samma prov (Tabell 2). Medan AER och algtester genomförs under aeroba förhållanden, efterliknar ditionitextraktionen en kraftigt reducerande och/eller H<sub>2</sub>S-rik miljö som inhiberar all återoxidering av Fe(II) (Uusitalo *et al.* 2003).

Tabell 2 Partikulärt P (PP) frigjort med olika metoder.

Metod	P frigjort PP
AER	6–10 % <sup>[1]</sup>
Dubbelkammaralgtest och AER	16 % <sup>[2]</sup>
Bikarbonat-ditionitextraktion	34–58 % <sup>[1]</sup>

[1] Uusitalo *et al.* 2003

[2] baserat på Uusitalo och Ekholm 2003; Uusitalo, 2004.

## 2.2 Mikrobiologisk verksamhet i bottensediment

### 2.2.1 Beskrivning av bottensedimenten

Bottensedimenten består av lera, silt, sand och organiskt material i olika skeden av nedbrytning (Manahan 2005, s. 109). Porvattnet, alltså det vatten som infiltrerar sedimenten, innehåller lösta former av  $\text{PO}_4$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{Fe(II)}$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4$ ,  $\text{SO}_4$  och  $\text{Mn(II)}$ .

I bottensedimentet mineraliseras det organiskt bundna P och det Fe-bundna P frigörs när Fe-oxiderna reduceras, varför det lösta P ökar med sedimentdjupet (Sundby *et al.* 1992; Lukkari *et al.* 2009; Lehtoranta & Heiskanen 2003). Den instiftade koncentrationsgradienten får P att migrera uppåt och det totala P att minska med sedimentdjupet (Sundby *et al.* 1992; Lehtoranta *et al.* 2004; Lukkari *et al.* 2009). Det lösta Fe ökar på grund av järnreduktionen och minskar sedan på grund av Fe-sulfidutfällning (Lehtoranta & Heiskanen 2003).

Det syresatta skiktet i sedimenten, vilket oftast är bara några millimeter till några centimeter djupt (Canfield *et al.* 2005, s. 197), fungerar som P-fälla. Fe(II) fångas upp av den oxiderade sedimentytan där det fälls ut som Fe(III)-oxider, vilka i sin tur binder och adsorberar P och hindrar det från att diffundera ut i det överliggande vattnet (Mortimer 1971). Fosfater adsorberas bäst på lågkristallina Fe-oxider (Slomp *et al.* 1998), vilka kan utgöra upp till 20 % av Fe i sediment (Thamdrup 2000, s. 44). Associationen med oxider är mer eller mindre reversibel och fungerar som en tillfällig P-sänka (Delaney 1998), eftersom den oxiderade ytan täcks av nytt sedimentterande material, vilket förr eller senare försätter det Fe(III)-oxidbundna P i anoxiska förhållanden (Gächter & Müller 2003). I eutrofierade vatten kan även bottensedimentytan vara syrefri som följd av den stora belastningen av organiskt material, och genom att syretillförseln hindras av stratifiering.

P bundet till redox-okänsliga metaller som Al och Ca är stabilt och varierar inte nämnvärt med djupet (t ex Lukkari *et al.* 2008). Fosfor begravs slutgiltigt främst associerad med  $\text{CaCO}_3$ , som organiskt P associerat med organiskt kol (C) och i form av autigent apatit (Delaney 1998).

pH i anoxiska marina sediment buffras mellan värdena 6,9 och 8,3. I höga pH-värden ökar  $\text{CO}_3^{2-}$  mångfald och fälls ut av  $\text{Ca}^{2+}$  i form av  $\text{CaCO}_3$ , vilket sänker pH och kontrollerar den övre pH-gränsen. Den undre pH-gränsen kontrolleras av Fe-sulfidutfällning, vilken höjer pH (Ben-Yaakov 1973).

I eutrofierade sötvatten och kustvatten kan pH stiga över 10, bland annat som en följd av intensifierad fotosyntes (Jeppesen *et al.* 1998). Hög alkalinitet stimulerar nedbrytningen av växtmaterial i vattenmiljöer, vilket i sig ökar syreförbrukningen och eutrofieringen, medan surhet har en inhiberande verkan (Brock *et al.* 1985).

Mikrobpopulationsstorleken i bottensedimenten rör sig i storleksklassen  $10^4$  till  $10^6$  celler/ $\text{cm}^3$  (Canfield *et al.* 2005, s. 36). Populationen består främst av bakterier. Svamparnas roll är underordnad i anoxiska sediment, speciellt om de är  $\text{H}_2\text{S}$ -rika (Canfield *et al.* 2005, s. 135). Bakterierna glesnar i allmänhet med djupet i sedimenten, men förekommer åtminstone hundratals meter ner (Parkes *et al.* 2000). Djupt ner i sedimenten kan arkéer dominera mikrobfloran (Jørgensen 2011).

### 2.2.2 Nedbrytning av organiskt material

Det organiska materialet minskar med djupet i sedimentet och den relativa andelen makromolekyler ökar i proportion till lättnedbrytbara föreningar som kolhydrater, lipider och proteiner (Arndt *et al.* 2013).

En del av det sedimenterade organiska materialet bryts ner och mineraliseras till sina oorganiska beståndsdelar, medan resten begravs utan att genomgå fullständig mineralisering och kan i stället med tiden bilda fossila kolväten (Canfield *et al.* 2005, s. 130). Nedbrytningen är mikrobiell och sker i tre huvudsakliga steg (Thamdrup & Canfield 2000, s. 86):

1. Hydrolys. Organiska polymerer bryts ner extracellulärt av hydrolytiska enzymer till makromolekyler.
2. Fermentation. Hydrolysisprodukterna bryts i sin tur ner av acetogena och fermenterande mikrober till bland annat acetat ( $\text{CH}_3\text{CO}_2^-$ ), väte ( $\text{H}_2$ ), etanol, laktat och metan ( $\text{CH}_4$ ). På grund av att fermentation ger lite energi är det

långsamt och bromsar upp det sista skedet, vilket i jämförelse är snabbt (Postma & Jakobsen 1996).

3. Mineralisering. C mineraliseras tillbaka till koldioxid ( $\text{CO}_2$ ) och karbonater ( $\text{HCO}_3^-$  och  $\text{CO}_3^{2-}$ ) genom respiration och till  $\text{CH}_4$  genom jäsning. De respirerande bakterierna använder vid sidan om  $\text{O}_2$  även  $\text{NO}_3$ , Mn-oxider, Fe-oxider och  $\text{SO}_4$  som elektronmottagare. Syre- och nitratreducerande organismer kan oxidera första stegets hydrolysisprodukter fullständigt till  $\text{CO}_2$ , medan de anaeroba bakterierna behöver fermentationsprodukter som laktat, acetat och  $\text{H}_2$  för att kunna verka i stor skala (Thamdrup & Canfield 2000, s. 86).

Vid nedbrytning agerar det organiska materialet elektrondonator och avger elektroner till elektronmottagaren (oxidationsmedlet) med högre reduktionspotential. Kolmineralisering innebär fullständig oxidation till oorganiskt  $\text{CO}_2$  och karbonater, där C antar oxidationsstadiet +4. Syrgas har den högsta reduktionspotentialen bland de naturligt förekommande oxidationsmedlen och förbrukas därför i första hand. Oxidation med syre sker både kemiskt och mikrobiologiskt.

### 2.2.3 Redoxzonering

I brist på syre tar mikroorganismer i bruk andra, svagare oxidanter enligt sjunkande reduktionspotential. Den nästbästa oxidanten efter  $\text{O}_2$  är  $\text{NO}_3$  följt av Mn(III & IV)-oxid, Fe(III)-oxid och  $\text{SO}_4$ . Till sist kommer metanogenesen i gång, i vilken  $\text{CH}_4$  och  $\text{CO}_2$  bildas (Arndt *et al.* 2013). En stor del av de reducerade oxidanterna återoxideras biotiskt och abiotiskt med syre vid det oxiska-anoxiska gränssnittet (Thamdrup & Canfield 2000, s. 87).

Hierarkin mellan oxidanterna med olika reduktionspotential ger upphov till olika redoxzoner i sedimentet, där ämnena med de högsta reduktionspotentialerna reduceras högst upp och ämnena med de lägsta reduktionspotentialer reduceras lägst ner. Med andra ord blir miljön mer reducerande och elektronaktiviteten stiger ju längre ner i sedimentet man kommer (Postma & Jakobsen 1996). Tabell 3 åskådliggör hur  $\Delta G^\circ$  stiger (energiutbytet sjunker) då acetat oxideras med allt svagare oxidanter

och till sist genomgår metanogenes. Observera att en mol acetat kan reducera åtta mol Fe-oxid men bara en mol SO<sub>4</sub>. Motsvarande överförs en elektron då Fe reduceras och åtta elektroner då SO<sub>4</sub> reduceras till H<sub>2</sub>S. Sulfatreduktionen sker i flera steg.

Tabell 3 Standard Gibbs fria energier (Canfield *et al.* 2005, s. 90).

Reaktion	$\Delta G^0/\text{mol C}$
	oxiderat (acetat)
Syrereduktion	-402
$\text{O}_2 + \frac{1}{2} \text{CH}_3\text{CO}_2^- \rightarrow \text{HCO}_3^- + \frac{1}{2} \text{H}^+$	
Denitrifikation	-359
$\frac{4}{5} \text{NO}_3^- + \frac{3}{5} \text{H}^+ + \frac{1}{2} \text{CH}_3\text{CO}_2^- \rightarrow \frac{2}{5} \text{N}_2 + \text{HCO}_3^- + \frac{1}{5} \text{H}_2\text{O}$	
Manganreduktion	-385
$\frac{7}{2} \text{H}^+ + 2\text{MnO}_2 + \frac{1}{2} \text{CH}_3\text{CO}_2^- \rightarrow 2\text{Mn}^{2+} + \text{HCO}_3^- + 2\text{H}_2\text{O}$	
Järnreduktion (färsk och amorf FeOOH)	-241
$\frac{15}{2} \text{H}^+ + 4\text{FeOOH} + \frac{1}{2} \text{CH}_3\text{CO}_2^- \rightarrow \text{HCO}_3^- + 4\text{Fe}^{2+} + 6\text{H}_2\text{O}$	
Sulfatreduktion	-43,8
$\frac{1}{2} \text{H}^+ + \frac{1}{2} \text{SO}_4^{2-} + \frac{1}{2} \text{CH}_3\text{CO}_2^- \rightarrow \frac{1}{2} \text{H}_2\text{S} + \text{HCO}_3^-$	
Metanogenes	-19,9
$\frac{1}{2} \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{CH}_3\text{CO}_2^- \rightarrow \text{CH}_4 + \frac{1}{2} \text{HCO}_3^-$	

Uppskattningsvis står sulfatreduktion för 55 % av den globala C-mineraliseringen i marina sediment, syreandning står för 23 %, järnreduktion för 17 % och denitrifikation för 5 % (Canfield *et al.* 2005, s. 200–201). I sötvatten, där  $\text{SO}_4$ -halten är låg, är järnreduktionen mera betydande än sulfatreduktionen (Canfield *et al.* 2005, s. 311, 324). I sjösediment kan järnreduktionen stå för nästan hälften av C-oxidationen, större än syrerrespirationen, medan sulfatreduktionen står för ca en femtedel (Thomsen *et al.* 2004). Låga  $\text{O}_2$ - och  $\text{NO}_3$ -halter ökar järn- och sulfatreduktionens relativa betydelse i sedimenten, och vid låga Fe-halter blir sulfatreduktionen och därmed  $\text{H}_2\text{S}$ -bildningen mera uttalad.

#### 2.2.4 Gibbs fria energi och substratkoncentrationer

Många metaboliska reaktioner framskrider nära sin termodynamiska jämvikt (Roden 2008 s 365; Jakobsen *et al.* 1998). Minimimängden energi som behövs för att lagra energi som ATP är  $-20 \text{ kJ/mol}$ , och  $\Delta G$  måste följaktligen vara lägre än det värdet för att cellen ska kunna utnyttja energin från reaktionen (Schink 1990).

$\Delta G$  beror på omgivningsfaktorer som temperatur och pH. Koncentrationerna av reagerter och produkter påverkar den fria energin starkt. I följande kemiska reaktion:



där de stora bokstäverna är komponenterna och de små bokstäverna deras stökiometriskta antal, gäller att

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{a_C^c a_D^d}{a_A^a a_B^b} \quad (2)$$

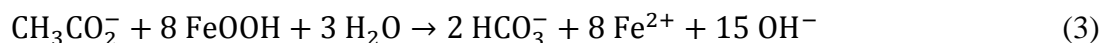
där  $\Delta G^\circ$  är Gibbs fria energi i standardtillstånd,  $R$  är gaskonstanten ( $8,314 \text{ J/(mol K)}$ ),  $T$  är temperaturen i kelvin (K) och  $a$  är aktiviteten. Om täljaren, alltså slutprodukternas koncentration, ökar, blir den sista faktorn större, vilket ger ett högre  $\Delta G$  och därmed gör reaktionen mindre termodynamiskt lönsam (och vice versa). För att en reaktion ska pågå kontinuerligt åt ett håll krävs alltså inte bara att råvarorna ständigt tillförs, utan också att slutprodukterna avlägsnas.

Ekvation (2) visar att högre råvarukoncentrationer gör reaktionen mera fördelaktig. Eftersom utgångspunkten ( $\Delta G^\circ$ ) för reduktion av flera Fe-oxider är mera fördelaktig än för sulfatreduktion, kan järnreducerande mikrober klara sig på lägre elektrondonatorhalter (t ex acetat) än sulfatreducerande mikrober. Genom att hålla nere halterna kan de konkurrera ut sulfatreducerarna (Lovley & Phillips 1987). På motsvarande sätt kan sulfatreducerande mikrober konkurrera ut metabolismer med ännu sämre utgångsläge (Canfield *et al.* 2005, s. 91). Minimiacetatkoncentrationen som krävs för tillväxt är i pH 7 vid järnreduktion  $0,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$ , sulfatreduktion  $2,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$  och metanogenes  $5,2 \pm 0,8 \mu\text{M}$  (Lovley & Phillips 1987).

## 2.3 Järn- och sulfatreduktion – dominerande anaeroba processer i bottensediment

### 2.3.1 Järnreduktion

Lovley & Phillips (1988) hör till de första att beskriva mikrobiell dissimilatorisk järnreduktion med Fe(III) som enda elektronmottagare. Under reduktion av Fe(III) till Fe(II) oxiderar bakterierna organiska föreningar som fettsyror, alkoholer, aromatiska föreningar och socker samt H<sub>2</sub> (Canfield *et al.* 2005, s. 294). Acetat är ett viktigt substrat (Canfield *et al.* 2005, s. 290):



Det trevärda järnets reduktionspotential ( $E_H^0$ ) är relativt högt, 0,77 V jämfört med SO<sub>4</sub>:s 0,23 V (Canfield *et al.* 2005, s. 76). Järnreduktionen kompliceras av att Fe(III) är praktiskt taget olösligt i normalt pH. Förutom i låga pH-värden förekommer Fe huvudsakligen i form av oxider, hydroxider och oxyhydroxider med varierande kristallinitet och ytareal. Järnoxiderna är olösliga och förekommer i aggregat från kolloidstorlek och uppåt. Man känner till åtminstone 15 olika Fe-oxider, varav götit och magnetit (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) under aeroba förhållanden är de termodynamiskt mest stabila och därför mest utbredda i jordarter och sediment (Schwertmann & Cornell 2008). Ju större ytareal, desto lättare mikrobiologiskt reducerbar är Fe-oxiden (Roden & Zachara 1996). Vissa Fe-fosfater är ännu mer gynnsamma oxidanter än amorfa Fe-oxider (Hyacinthe & Van Cappellen 2004). Amorfa och instabila Fe-oxider, såsom ferrihydrit, är termodynamiskt mera lönsamma oxidationsmedel än SO<sub>4</sub>. Ju stabila Fe-oxider, desto mer fördelaktigt är dock sulfatreduktion (Postma & Jakobsen 1996).

Majoriteten av de hittills kända järnreducerande bakterierna tillhör familjen *Geobacteraceae* (t ex *Geobacter*), *Deferribacteraceae* (*Geovibrio*), *Campylobacteraceae* (t ex *Geospirillum*) och gruppen *Shewanella-Ferrimonas-Aeromonas* (t ex *Shewanella*). *Geobacteraceae* är obligata anaerober eller mikroaerofiler och är ofta kapabla till fullständig oxidation av organiska föreningar som acetat, medan *Shewanella-Ferrimonas-Aeromonas* är fakultativa anaerober vilka använder sig av H<sub>2</sub>-oxidation eller ofullständig oxidation av t ex laktat till acetat.



Eftersom syreandning ger mer energi använder sig de fakultativa anaeroberna av syre när det finns tillgängligt. Järnreduktion utförs dessutom av flera hypertermofila *Archae* (Canfield *et al.* 2005, s. 292; Madigan *et al.* 2009).

Eftersom mikroberna är hänvisade till mer eller mindre olösliga Fe-oxider måste järnreduktionen ske extracellulärt. Flera olika mekanismer för att uppta Fe förekommer i mikrobvärlden. Vad som i detalj händer på en molekylärskala mellan cellytan och Fe(III)-oxiden är inte klarlagt (Weber *et al.* 2006).

*Geobacter*-arter kräver direktkontakt med Fe-oxidytan för att kunna reducera Fe (Nevin & Lovley 2000; Lovley 2000). Arterna rör sig kemotaktiskt mot olösliga Fe- och Mn-oxider med hjälp av flagella och pili (Childers *et al.* 2002). Dessa pili kan vara elektriskt ledande, så kallade bakteriella nanokablar, hos åtminstone *Geobacter sulfurreducens* (Reguera *et al.* 2005) och *Shewanella oneidensis* (Gorby *et al.* 2006).

Vissa arter av *Shewanella* och *Geothrix* behöver inte direktkontakt med Fe-oxiden, utan utsöndrar elektronskyttlande föreningar. *Shewanella algae* utsöndrar extracellulärt melanin som bakterien reducerar, varpå det reducerade melaninet i sin tur reducerar olösliga Fe-oxider (Turick *et al.* 2002). *Geothrix fermentans* utsöndrar ämnen som löser upp den annars olösliga Fe-oxiden och bakterien får tillgång till löst Fe(III) (Nevin & Lovley 2002). Via den här mekanismen kan mikroberna reducera Fe-oxiderna på avstånd.

På senare tid har en kombination av taxis och elektronskyttlar upptäckts. *Shewanella oneidensis* utsöndrar det redox-aktiva kinonet riboflavin, vilket fungerar som både elektronskyttel och attraktant för cellens energitaxis. Det reducerade riboflavinet diffunderar till den olösliga Fe-oxiden där det oxideras, varefter det rör sig bort. På det här sättet instiftas en gradient med vilken cellen orienterar sig mot partikeln (Li *et al.* 2012).

Det krävs mycket energi för att producera kelaterande och elektronskyttlande föreningar, varför direkt elektronöverföring antagligen ändå är den viktigaste formen av järnreduktion i naturen (Roden 2008 s 369). *Geobacter*, vilka använder sig av direktkontakt, är de dominerande arterna i flera naturliga miljöer (Lovley 2000).

Trots utmaningarna med extracellulär järnreduktion kan järnreduktion ha varit den första formen av andning (Walker 1987; Vargas *et al.* 1998; Lovley 2000).

Vissa mikrober kan använda humusämnen som elektronacceptorer. Humusämnena kan sedan skyttla vidare elektronerna till olösliga Fe-oxider (Lovley *et al.* 1996). Förmågan att reducera humusämnen är allmänt förekommande. De mikroorganismer som kan reducera Fe indirekt på det här sättet är till och med 10–100 gånger vanligare än de egentliga järnreducerande bakterierna (Kappler 2004).

Det cirkumneutrala pH som råder i marina sediment lämpar sig väl för järnreducerande bakterier, vilka ofta kräver pH mellan 6 och 8 (Canfield *et al.* 2005, s. 285). I eutrofierade sötvatten och kustvatten kan pH dock stiga över 10 (Jeppesen *et al.* 1998). Exempel på alkalifila bakterier som kan växa i pH över 10 är varianter av *Bacillus arsenicoselenatis* (Switzer Blum *et al.* 1998), *Alkaliphilus metallireducens* (Ye *et al.* 2004), *Anaerobranca californiensis* (Gorlenko *et al.* 2004) och *Bacillus* (Pollock *et al.* 2007).

Så länge sedimenten innehåller mycket Fe kan de låsa betydande mängder P även om de är syrefria och reducerande (Roden & Edmonds 1997). Under reducerande förhållanden kan Fe(II) fortfarande binda P utan att återoxideras till Fe(III). Den mikroalkalina miljö som uppstår vid själva järnreduktionen möjliggör bildande av P-adsorberande Fe(II)-hydroxider (Patrick & Khalid 1974; Roden & Edmonds 1997). Ferrojärn kan också fälla ut P i Fe(II)-fosfater såsom vivianit ( $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ ) (Roden & Edmonds 1997; Gächter & Müller 2003). Järnreduktionens produkter,  $\text{Fe}^{2+}$  och  $\text{HCO}_3^-$ , reagerar ofta vidare till siderit ( $\text{FeCO}_3$ ), som lägger sig som en hindrande fällning på oxidens yta (Hacherl *et al.* 2003).

För omfattande P-frigörelse krävs sulfatreduktion med  $\text{H}_2\text{S}$ -bildning. Närvaro av  $\text{SO}_4$  i bottensedimenten har visat sig öka P-frigörelsen flerfald (Caraco *et al.* 1990; Roden & Edmonds 1997; Katsev *et al.* 2006). Vätesulfid reagerar med Fe såväl i löst form ( $\text{Fe}^{2+}$ ) och i fast oxidform (t ex Yao & Millero 1996) som i siderit och vivianit (Gächter & Müller 2003). Därmed hindrar  $\text{H}_2\text{S}$  Fe från att binda P, men den putsar också bort hindrande Fe(II)-lager från Fe-oxidens yta och underlättar således fortsatt järnreduktion (Roden & Zachara 1996).

### 2.3.2 Sulfatreduktion

På grund av hög aktiveringsenergi kräver abiotisk sulfatreduktion temperaturer över 100 °C (Machel 1998) och är därför inte av betydelse i vanliga bottensediment. Mikrober kan däremot överbrygga aktiveringsenergin genom aktivering med ATP (Madigan *et al.* 2009, s. 627–628). Mikrobiell sulfatreduktion förekommer på mer än 5000 meters djup, ner till över en meter ner i bottensedimenten, i 0-100 °C och i saltkoncentrationer upp till 28 % NaCl (Canfield *et al.* 2005, s. 323; 325; 338).

Sulfatreducerande mikrober har en helt annan utgångspunkt än de järnreducerande mikroberna, i och med att SO<sub>4</sub> finns löst i alla naturliga vatten och bottensediment. Sötvattensmiljöer innehåller ofta 10-500 µM SO<sub>4</sub>, medan havsmiljöer innehåller ca 28 mM och brackvattnet i Finska viken ca 3,5 mM. Aktiv sulfatreduktion kan ske i SO<sub>4</sub>-koncentrationer på mindre än 1 µM (Canfield *et al.* 2005, s. 337) och vid koncentrationer över bara ca 3 mM SO<sub>4</sub> är sulfatreduktionshastigheten i marina sediment i praktiken oberoende av SO<sub>4</sub>-koncentrationen (Boudreau & Westrich 1984; Roden & Tuttle 1993). Det som begränsar SO<sub>4</sub>:s duglighet som oxidationsmedel är istället dess låga reduktionspotential (Tabell 3).

Trots lägre SO<sub>4</sub>-halter och glesare bakteriepopulation kan sulfatreduktionen i sötvattensediment uppnå hastigheter motsvarande eller till och med högre än i marina och bräckta sediment (Pallud & Van Cappellen 2006). Förklaringen ligger dels i att sötvattensbakterier har högre affinitet för SO<sub>4</sub> än marina bakterier (Smith & Klug 1981; Ingvorsen *et al.* 1984; Roden & Tuttle 1993). Mängden organiskt material och dess kvalitet är i slutändan de enda faktorer som har en betydande inverkan på sulfatreduktionshastigheten i naturliga vatten (Westrich 1983).

De viktigaste elektrondonatorerna är enkla jäsningsprodukter såsom laktat, H<sub>2</sub>, pyruvat, acetat, formiat, suckinat och alkoholer men i viss utsträckning kan även socker, sulfonater, aromatiska föreningar och aminosyror oxideras. Fettsyror och raka alkener till och med upp till C<sub>20</sub> kan duga som substrat (Canfield *et al.* 2005, s. 331). En del sulfatreducerare genomför ofullständig oxidation av t ex laktat, pyruvat och alkoholer till acetat, medan andra förmår oxidera fettsyror som laktat och acetat fullständigt till CO<sub>2</sub> (Madigan *et al.* 2009, s. 439). I de fall H<sub>2</sub> används som

elektronondonator krävs en utomstående C-källa, t ex CO<sub>2</sub> eller acetat (Madigan *et al.* 2009, s. 628). De fullständigt oxiderande sulfatreducerarna växer långsamt och konkurreras snabbt ut av ofullständigt oxiderande sulfatreducerare då laktat finns att tillgå (Canfield *et al.* 2005, s. 333).

Sulfatreduktion med acetat som substrat sker enligt följande sammanfattande reaktionslikhet (Canfield *et al.* 2005, s. 333):

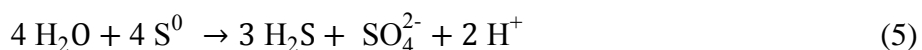


$$\Delta G^{\circ'} = -43,8 \text{ kJ/mol (se Tabell 3)}$$

Sulfatreduktionen producerar H<sub>2</sub>S, vilken är en färglös, stinkande gas. Upplöst i vatten är den en svag syra. Vätesulfid är giftig för de flesta organismer inkluderat de sulfatreducerande bakterierna (Reis *et al.* 1992).

Sulfatreducerande bakterier kan i allmänhet reducera tiosulfat (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>) och sulfit (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) som ett alternativ till SO<sub>4</sub>. Många reducerar även elementärt S och i vissa fall kan även NO<sub>3</sub>, Fe(III) och till och med O<sub>2</sub> tjäna som elektronmottagare (Canfield *et al.* 2005, s. 320; 343). Även om flera sulfatreducerande bakterier till en viss grad kan tolerera syre är de företrädesvis anaeroba till sin natur och många är strikta anaerober (Canfield *et al.* 2005, s. 337).

Svaveldisproportionerande bakterier förekommer också rikligt i anoxiska sediment. De får energi genom exempelvis följande sammanfattade reaktion (Thamdrup *et al.* 1993):

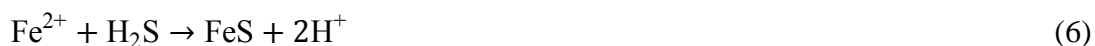


Många vanliga sulfatreducerande bakterier tillhör *Desulfobacteraceae*, varav *Desulfococcus* och *Desulfosarcina* påvisats vara de dominerande arterna i både estuarium (Kondo *et al.* 2007), övergången mellan Östersjön och Nordsjön (Sahm *et al.* 1999), samt i ett marint arktiskt sediment (Ravenschlag *et al.* 2000). *Desulfobacterium* och *Desulfonema*, samt *Desulforhopalus*, *Desulfotalea*, *Desulfofustis* och *Desulfobulbus* av *Desulfobulbaceae* är också vanliga i marina och bräckta

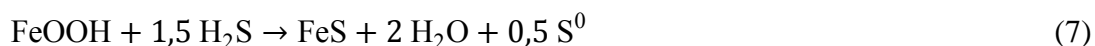
sediment, medan *Desulfotomaculum* av fylum *Firmicutes* troligtvis är en sötvattenbakterie (Sahm *et al.* 1999; Kondo *et al.* 2007). Brackvatten påminner till bakteriesammansättningen mer om marina miljöer än om sötvatten (Kondo *et al.* 2007). Förutom bakterier kan även arkéer av det hypertermofila släktet *Archaeoglobus* få energi för tillväxt genom sulfatreduktion (Madigan *et al.* 2009, s. 627–628).

### 2.3.3 Järnsulfidbildning

I H<sub>2</sub>S-haltiga miljöer är Fe-sulfidbildning den dominerande utfällningsreaktionen för Fe<sup>2+</sup> (Chapelle *et al.* 2009):



Vätesulfid reducerar även Fe(III)-oxider (Yao & Millero 1996):



Reaktionen med H<sub>2</sub>S är den viktigaste abiotiska Fe(III)-reduktionsmekanismen i naturliga sediment (Yao & Millero 1996). I grunda marina kustsediment konkurrerar den abiotiska Fe(III)-reduktionen med den mikrobiella, medan mikrobiell reduktion dominerar i sötvattensystem där SO<sub>4</sub>-halten är låg (Thamdrup 2000; Roden 2008 s. 369).

Reaktionen är snabbast omkring pH 6,5–7 (Yao & Millero 1996; Yao 1995; Peiffer *et al.* 1992) eller 5,5–6 (Poulton *et al.* 2003) och höjer pH monotont (Soetaert *et al.* 2007). Reaktionen mellan H<sub>2</sub>S och Fe-oxider sker genom sulfidkomplexbildning på Fe-oxidens yta och är beroende av tillgängliga reaktionsställen. Under neutrala och sura förhållanden kan SO<sub>4</sub> tävla om samma adsorptionsställen som H<sub>2</sub>S och inhibera Fe-sulfidbildning (Poulton *et al.* 2003). Järnreduktionen täcker Fe(III)-oxiderna med ett hindrande lager av Fe(II) (Hyacinthe & Van Cappellen 2004). Vätesulfider kan underlätta järnreduktionen genom att fälla ut Fe(II) och göra Fe(III) åtkomligt för vidare reduktion (Weston *et al.* 2006).

I koncentrationer på 0,5 mM kan H<sub>2</sub>S reducera även kristallina Fe-oxider som götit och hematit (Postma & Jakobsen 1996). Lågkristallina mineraler såsom hydrerad ferrihydrit och lepidokrokitt reagerar dock mycket snabbare, i en tidsskala på minuter och timmar, medan de mera kristallina mineralerna götit, magnetit och hematit reagerar inom en skala på tiotals dagar (Poulton *et al.* 2004). Så länge reaktiva Fe-oxider finns att tillgå ackumuleras H<sub>2</sub>S inte i bottensedimentet över 1 µM ens vid aktiv sulfatreduktion (Canfield 1989). I brist på reaktivt Fe ackumuleras den giftiga H<sub>2</sub>S i porvattnet och diffunderar ut ur sedimentet (Canfield *et al.* 1992).

Järnmonosulfid oxideras till pyrit (FeS<sub>2</sub>) av H<sub>2</sub>S i svagt basiska till sura reducerande miljöer och av elementärt svavel i oxiderande miljöer (Rickard & Luther 1997):



HS<sup>-</sup> reagerar betydligt långsammare med FeS än vad H<sub>2</sub>S gör. Eftersom H<sub>2</sub>S:s pK<sub>a1</sub> är 7, och HS<sup>-</sup> alltså dominerar i pH över 7, är pyritbildning med H<sub>2</sub>S mera gynnad i sura miljöer än i basiska (Rickard & Luther 1997). En undersökning av Östersjöns historiska sediment visar att sulfidmineralerna i den före detta bräckta vattenmiljön domineras av pyrit (FeS<sub>2</sub>) och i sötvattenmiljön av Fe-monosulfider (FeS) (Böttcher & Lepland 2000).

Både FeS och FeS<sub>2</sub> är i praktiken olösliga och återoxidering av Fe(II) till Fe(III) förekommer inte i H<sub>2</sub>S-haltiga sediment. Järnet låses därför i sulfidföreningarna och avskiljs från P:s kretslopp så länge syrefrihet råder (Gächter & Müller 2003). Järnsulfid färgar sedimenten svarta medan icke-sulfidhaltiga, reducerade sediment antar en grågrön nyans (Roden & Edmonds 1997). Pyrit är ljusare än FeS (Fanning *et al.* 1993).

#### 2.3.4 Samband mellan pH och järn- och sulfatreduktion

Huruvida sulfat- eller järnreduktion är mera fördelaktigt avgörs av pH och Fe-oxidernas form. Eftersom det i naturliga förhållanden finns ett brett spektrum Fe-oxider av varierande stabilitet, sker sulfat- och järnreduktion i praktiken ofta jämsides (Postma & Jakobsen 1996).

Både järnreduktionen och sulfatreduktionen blir termodynamiskt gynnsammare med stigande pH, men järnreduktionen påverkas i betydligt större grad än sulfatreduktionen. Ända upp till ca pH 9 är amorft FeOOH ett mera fördelaktigt oxidationsmedel än SO<sub>4</sub>, medan SO<sub>4</sub> är mera gynnsamt i högre pH-värden. Den kristallina Fe-oxiden götit är termodynamiskt lönsammare än SO<sub>4</sub> endast i pH under ca 6,3 (Canfield *et al.* 2005, s. 92; Postma & Jakobsen 1996).

Sulfatreduktion har uppgetts öka alkaliniteten i naturliga miljöer (Lamers *et al.* 1998). Det kemiska ekvilibrium-pH, alltså det pH som uppnås om sulfatreduktionen tillåts pågå i ett slutet system, är dock ca 6,6 (Nriagu & Hem, 1978, s. 244), 6,7 (Soetaert *et al.* 2007) eller 6,9 (Ben-Yaakov 1973), beroende på bland annat utgångs-pH. För att pH ska höjas krävs att den bildade, svagt sura, H<sub>2</sub>S avlägsnas, antingen genom Fe-sulfidutfällning eller genom utgasning (Ben-Yaakov 1973).

Om H<sub>2</sub>S reagerar med redan reducerat Fe<sup>2+</sup> sker dock ingen pH-höjning utan tvärtom sjunker pH monotont. Däremot höjer den Fe<sup>2+</sup>-bildande mikrobiella järnreduktionen pH monotont (Soetaert *et al.* 2007). Mest stiger pH då H<sub>2</sub>S och Fe-hydroxider bildar FeS och därefter reagerar vidare till pyrit (FeS<sub>2</sub>) (Boudreau & Canfield 1993; Soetaert *et al.* 2007).

Tabell 4 Utvalda reaktioners inverkan på pH (Soetaert *et al.* 2007).

Reaktion	Inverkan på pH
$\text{CO}_3^{2-} + \text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{CaCO}_3$	↓
$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{FeS} + 2 \text{H}^+$	↓
$\text{Fe}^{2+} + \text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{FeCO}_3$	↓
Sulfatreduktion med organiskt material	→ 6,6–6,9*
$\text{CH}_3\text{CO}_2^- + 8 \text{FeOOH} + 3 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{HCO}_3^- + 8 \text{Fe}^{2+} + 15 \text{OH}^-$	↑
$\text{FeOOH} + 1,5 \text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{FeS} + 2 \text{H}_2\text{O} + 0,5 \text{S}^0$	↑
$\text{FeS} + \text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{FeS}_2 + \text{H}_2$	↑

\* (Ben-Yaakov 1973; Nriagu & Hem, 1978 s. 244; Soetaert *et al.* 2007)



## 2.4 Arbetets syfte

Arbetets syfte är att undersöka

1. hur mycket P som kan frigöras i  $\text{SO}_4$ -haltiga och anaeroba sediment
2. om C-tillsatsen kan öka fosforfrigörelsen ur åkerjordpartiklar genom att fungera som substrat för mikrobiologisk järn- och sulfatreduktion, och i vilken grad
3. hur mängden jord i förhållande till vatten inverkar på frigörelsen.

Hypoteserna är att

1. acetatet ökar P-frigörelsen genom att fungera som elektronavgivare för den dissimilatoriska sulfat- och järnreduktionen
2. järnoxiderna i åkerjorden inhiberar sulfatreduktion genom att fungera som det mest gynnsamma oxidationsmedlet vid oxidationen av C (Lovley 1991; Ekholm & Lehtoranta 2012)
3. mängden frigjort P inte överskrider BD-P eftersom BD-extraktion simulerar reducerande förhållanden utan återoxidering av Fe (Uusitalo 2004).

### 3 Material och metoder

För att undersöka hur mycket P som kan frigöras efter att eroderade åkerjordpartiklar hamnar på havets botten genomfördes två simuleringsexperiment. Experimenten var designade på liknande sätt men genomfördes på olika ställen och analyserades med olika mätmetoder (Figur 3–4).

#### 3.1 Provförberedning

Det första experimentet genomfördes vid Finlands miljöcentrals laboratorium i Håkansåker. Lösningen bestod av syntetiskt brackvatten (Tabell 5) med extra hög  $\text{SO}_4$ -halt och var 80 ml i 100 ml flaskor. Sulfathalten var 2400 mg/l (25 mM), alltså nästan fem gånger halten i Finska viken, medan de andra jonerna hade koncentrationer typiska för brackvatten. Acetat tillsatsen var 0–24 mg i C-vikt. Dag 141 och 196 tillsattes C, men man försummade att anteckna den tillsatta mängden. Den var i varje fall proportionerlig mot den ursprungliga tillsatsen och betecknas här  $C \cdot x$  och  $C \cdot y$ .

Det andra experimentet genomfördes i Helsingfors universitets laboratorium i Vik. I Vikexperimentet användes äkta autoklaverat brackvatten från Finska viken som lösning (Tabell 5). Ytvatten samlades upp på våren vid en brygga på 4 meters djup i Jollas, Helsingfors. Som pH-buffert användes 1,514 g av Tris-bufferten (tris(hydroxymetyl)aminometan) Sigma Trizma base utspädd i 25 ml destillerat vatten. Acetat tillsattes bara i början (0,375–24 mg angivet som C). Efter justeringen var pH 8,14, men pH mättes inte på nytt efter natriumacetat tillsatsen. Flaskorna var 100 ml och lösningarna ca 80 ml.

Tabell 5 Det syntetiska och det naturliga brackvattnets sammansättningar. Det naturliga brackvattnet analyserades i slutet av experimentet med ICP-OES, vilket ger grundämneskoncentrationer (se kapitel 4). Åkerjordens bidrag är inte medräknat.

Ämne		Koncentration (mg/l)
		Syntetiskt brackvatten (Håkansböle)    Naturligt brackvatten (Vik)
Cl	3310	-
SO <sub>4</sub>	2400	320
Na	1840	830
Mg	200	173
Ca	90	67
K	68	47
Mn	-	6,2
Si	-	1,5
P	-	0,04
Fe	-	0,008
Al	-	0,003

Den använda åkerjorden var sandig lerjord med måttlig P-status som var taget från ytjorden av en kultiverad åker i Tammela, Kaukjärvi (södra Finland) (Tabell 6). Totalfosforhalten var ca 1,5 mg/g (ca 50 µmol/g). Järn- och aluminiumhalten analyserades med oxalatextraktion, vilken löser upp främst amorfösa Fe- och Al-oxider, medan BD extraherar även en stor del av de kristallina Fe-oxiderna (McKeague & Day 1966). BD-extraktionen gav lägre värden än oxalatextraktionen:

1,7 mg/g BD-Fe jämfört med 9,7 mg/g oxalat-Fe. BD-P var 0,2 mg/g P vilket ger Fe/P (mol/mol) 4,5 i BD-fraktionen. Jordmånen i Finland innehåller ca 16–71 mg Fe/g jord (ca 0,3–1,3 mmol/g) (Sippola 1974), vilket kan ses som ett riktgivande värde för den totala Fe-halten. Fe/P-förhållande i jordmaterialet var således i genomsnitt 6–26.

Tabell 6 Åkerjordens sammansättning.

Ämne	Analys			Enhet
Ca	Markkarteringsanalys*	3035		mg/l
K	Markkarteringsanalys*	366		mg/l
Mg	Markkarteringsanalys*	1061		mg/l
P	Markkarteringsanalys*	15,03		mg/l
	Vattenextraktion	1:30	11,8	mg/kg
		1:50	17,9	mg/kg
		1:100	30,1	mg/kg
	BD		207	mg/kg
	Organiskt bundet P (uppskattning)	ca 200–250		mg/kg
	Anjonutbyte,	2 h	61	mg/kg
	resinextraktion (AER)	18 h	124	mg/kg
	Total-P (Bowman 1988)		1475	mg/kg
Fe	Bikarbonat-ditionitextraktion		1680	mg/kg
	Oxalatextraktion, pH 3		9745	mg/kg
Al	Oxalatextraktion, pH 3		2551	mg/kg
pH			6,6	-
C			2,3	%
N			0,19	%

\*Markkarteringsanalysen anger halter av lättlösliga ämnen.

Det vattenextraherbara P analyserades genom att väga upp jord i 50 ml stora centrifugtuber med 40 ml vatten för att erhålla slutliga koncentrationer om 0,62, 0,98, 1,50, 1,79, 2,62 och 3,00 g/l. Tuberna skakades under 15 minuter i rumstemperatur, filtrerades omedelbart (0,2- $\mu$ m Whatman/Nuclepore-polykarbonatfilter) och analyserades för reaktivt P. Kemisk reduktion av Fe simulerades genom extraktion med buffrad ditionit (Uusitalo & Turtola 2003). Liksom ovan vägdes jorden upp i 50 ml stora centrifugtuber (0,60, 0,95, 1,70, 2,18, 2,63 and 3,25 g/l), varefter 40 ml destillerat vatten, 1 ml 0,298 M NaHCO<sub>3</sub> och 0,574 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> tillsattes. Tuberna skakades under 15 minuter, filtrerades (0,2- $\mu$ m Whatman/Nuclepore-polykarbonatfilter) och analyserades för totalt löst P och löst Fe (*Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy*, ICP-OES). Det redox-labila partikulära P angavs som skillnaden mellan vattenextraherbara P och P extraherbart med buffrad ditionitlösning.

Jorden innehöll 2,3 % C och var svagt sur. Det organiskt bundna P var uppskattningsvis omkring 0,20–0,25 mg/g.

För att minimera antalet provflaskor valdes en reducerad, fraktionell faktoriell design. Samma experimentdesign användes i båda experimenten med undantag av några fler replikprov i Vikexperimentet (Tabell 7). Variablerna C och jord var svagt kolinjära ( $R^2 = 0,18$ ).

Tabell 7 Antal prover med de olika koncentrationerna (H syftar på Håkansböle-experimentet och V på Vik).

C (mg)	Jord (g)						
	0,06	0,09	0,13	0,25	0,5	0,71	1
0	2	-	-	-	-	-	2
0,375	-	2 (H), 3 (V)	-	-	-	-	-
0,75	1	-	-	1	-	-	-
1,5	-	-	1	1	-	-	-
3	-	2 (H), 3 (V)	-	5	-	2 (H), 3 (V)	-
6	-	-	-	1	1	-	-
12	-	-	-	1	-	-	1
24	-	-	-	-	-	2 (H), 3 (V)	-

### 3.2 Inkubation

Båda experimentens prover inkuberades anaerobt i kylrum. I Håkansböleexperimentet inkuberades proverna under skakning i 308 dagar i mörker och +10 °C. I Vik inkuberades proverna utan skakning i mörker och omkring +5 °C under 861 dagar.

### 3.3 Provtagning

#### 3.3.1 Provtagning i Håkansböle

Den totala P-halten mättes dag 141, 196 och 308. Fe<sup>2+</sup> mättes ännu tätare. Dag 308 mättes dessutom det totala Fe, SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>-N, löst organiskt C (DOC, *dissolved*

*organic carbon*) och pH. Proverna togs med en nål som injicerades genom flaskornas täta korkar för att undvika gasutbyte.

### 3.3.2 Provtagning i Vik

Dag 738 togs proverna i anaerobskåp. De späddes ut och filtrerades med WWR International 25 mm Syringe Filter w/o 0,2 µm (Polypropylene membrane, European Article no 514-0064), inför ICP-OES-analysen. Filterporerna på 0,2 µm släpper inte bara igenom lösta joner som PO<sub>4</sub> och Fe(II) utan också fina partiklar, kolloidpartiklar och makromolekyler (Broberg och Persson 1988). Amorfa Fe(III)-oxider förekommer ofta som icke-sedimenterande kolloider, vilka kan passera filtret (t ex Jonsson 1997). Bakterier passerar dock inte filtret (Madigan *et al.* 2009, s. 68).

Under den andra provtagningen dag 861 öppnades flaskorna i anaerobskåp. Ur alla flaskor togs tre parallella prover för ICP-OES-, SO<sub>4</sub>- och H<sub>2</sub>S-analys, varefter pH mättes. Samma sorts filter användes, men proverna späddes inte ut.

Eftersom korkarna öppnades bör en del H<sub>2</sub>S ha rymt i gasform, vilket påverkar H<sub>2</sub>S-analysresultaten. Även pH-värdet påverkas om H<sub>2</sub>S, NH<sub>4</sub> och CO<sub>2</sub> rymmer ur systemet (t ex Ben-Yaakov 1973). Vid anaerobskåpet kändes en lukt av H<sub>2</sub>S, vilket tydde på en läcka. Syrgas kan därför också ha strömmat in i skåpet och oxiderat en del av H<sub>2</sub>S.

Några av flaskorna stöttes i misstag till så att den sedimenterade partiklarna på botten rördes om. Även om partiklarna tilläts sedimentera under flera minuter innan provtagningen är det möjligt att händelsen påverkade resultaten.

## 3.4 Analysmetoder

Mätmetoderna skilde sig i de två experimenten. I Håkansböle användes främst fotometrisk metod och Vik användes främst optisk emissionsspektroskopi med induktivt kopplad plasma (ICP-OES). I Håkansböle användes för total-P-analysen hydrolys med peroxodisulfat. Eftersom experimenten genomfördes på olika ställen

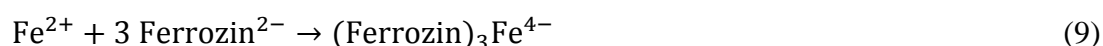


av olika personal och med olika metoder kan resultaten inte anses vara fullt jämförbara.

#### 3.4.1 Mätning i Håkansböle

Vattnets totala P-halt bestämdes fotometriskt. Den använda metoden går ut på att oorganiska P-föreningar och organiskt bunden P bryts ner till reaktivt PO<sub>4</sub> med kaliumperoxodidsulfat (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) i autoklav under sura förhållanden, 2 atm och 120 °C. Ortofosfatet bildar antimon-12-fosformolybdensyra tillsammans med molybdat och trevärd antimon. Ascorbinsyra reducerar den till ett blått kolloidalt komplex. Komplexets absorbans mäts på 880 nm:s våglängd.

Ferrozinanalys användes för att bestämma halten av Fe<sup>2+</sup>:



Vattnets totala Fe-innehåll mättes fotometriskt (SFS 3028, 1976). Metoden är lämplig för att mäta total-Fe-halten i naturvatten och lindrigt nersmutsade vatten. Järnet görs reaktivt genom att oxidera det med peroxidsulfat i autoklav under sura förhållanden. Fe(III) reduceras till Fe(II) med hydroxylammoniumklorid, varefter Fe(II) tillsammans med 2,4,6-tri(2'-pyridyl)-1,3,5-triazin (TPTZ) bildar det violetta komplexet Fe(TPTZ)<sub>2</sub><sup>2+</sup> inom pH-intervallen 3,4–5,8. Föreningens absorbans mäts på våglängden 593 nm.

Ammoniumkväve (NH<sub>4</sub>-N) mättes enligt standarden SFS 3032, 1976-03-26. Ammoniumjonen tillåts bilda monokloramin tillsammans med hypoklorit i en basisk lösning (pH 10,8–11,4). Under närvaro av fenol och ett överlopp av hypoklorit bildar monokloraminet indofenolblått. Som katalysator används pentacyanonitrosylferrat (nitroprussid). Absorbansen mättes på våglängden 630 nm.

Sulfatjonerna bestämdes jonkromatografiskt enligt standarden SFS-EN ISO 10304-1 i2007 (del 1: metoder för lindrigt förorenade/lätt smutsiga vatten).

Vattnets lösta organiska C (DOC) mättes enligt standarden SFS-EN 1484, 1997. DOC mäts som det sammanlagda organiskt bundna C som lyckas ta sig igenom

membranfiltret med porstorkleken 0,45 µm. Efter filtreringen avlägsnas oorganiskt C genom att göra provet surt och bubbla upp det. Sedan oxideras det organiska C till CO<sub>2</sub> genom förbränning vid 850 °C och den bildade CO<sub>2</sub> mäts med infraröd-spektrometri.

pH bestämdes potentiometriskt enligt standarden SFS 3021, 1979 med en pH-mätare som är kopplad till en kombinationselektrod. Alla mätmetoder utom ferrozinanalysen var krediterade.

### 3.4.2 Mätning i Vik

Utvalda grundämnens totalhalter i filtratet mättes med ICP-OES (Thermo iCAP6000): Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Si och S. ICP-OES är en form av emissionsspektroskopi. Den effektiva ICP-ljuskällan bildar plasma med tillräckligt hög temperatur för att excitera både joner och neutrala atomer. Atomerna sänder ut en karakteristisk våglängd när de återgår till sitt grundtillstånd. Den uppmätta våglängden identifierar grundämnet och strålningsintensiteten anger respektive koncentration. En av fördelarna med ICP-OES är att den möjliggör samtidig detektion av flera ämnen ur samma prov. Systematiska och slumpmässiga fel kan dock förekomma (Fassel & Kniseley 1974).

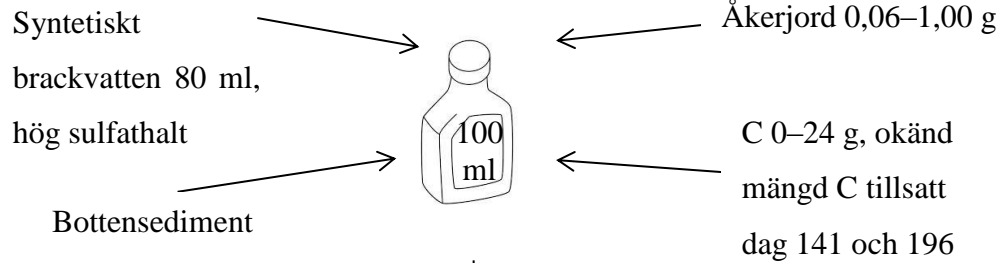
Sulfatjonerna mättes på samma sätt som i Håkansböle. Analysen utfördes i Finlands miljöcentrals miljömättnings- och testningslaboratorium i Uleåborg.

Vätesulfidanalysen utfördes i Novalab Ab med Hach Langes (LCK 653) färdiga kyvetttest. Metoden grundar sig på standarden SFS 3042 (vätesulfidbestämning i avloppsvatten, kolorimetrisk metod). Bestämningsgränsen är 0,1 mg/l eftersom mätosäkerheten är ± 40 % vid lägre halter.

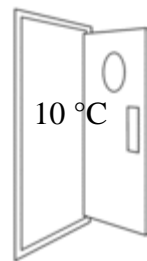
pH mättes potentiometriskt i anaerobskåpet i rumstemperatur med pH-mätare som är kopplad till en kombinationselektrod.

Metoderna sammanfattas i Figur 3 och Figur 4.

1. Förberedning



2. Inkubation i kylrum



3. Provtagning genom korken  
dag 141, 196 och 308

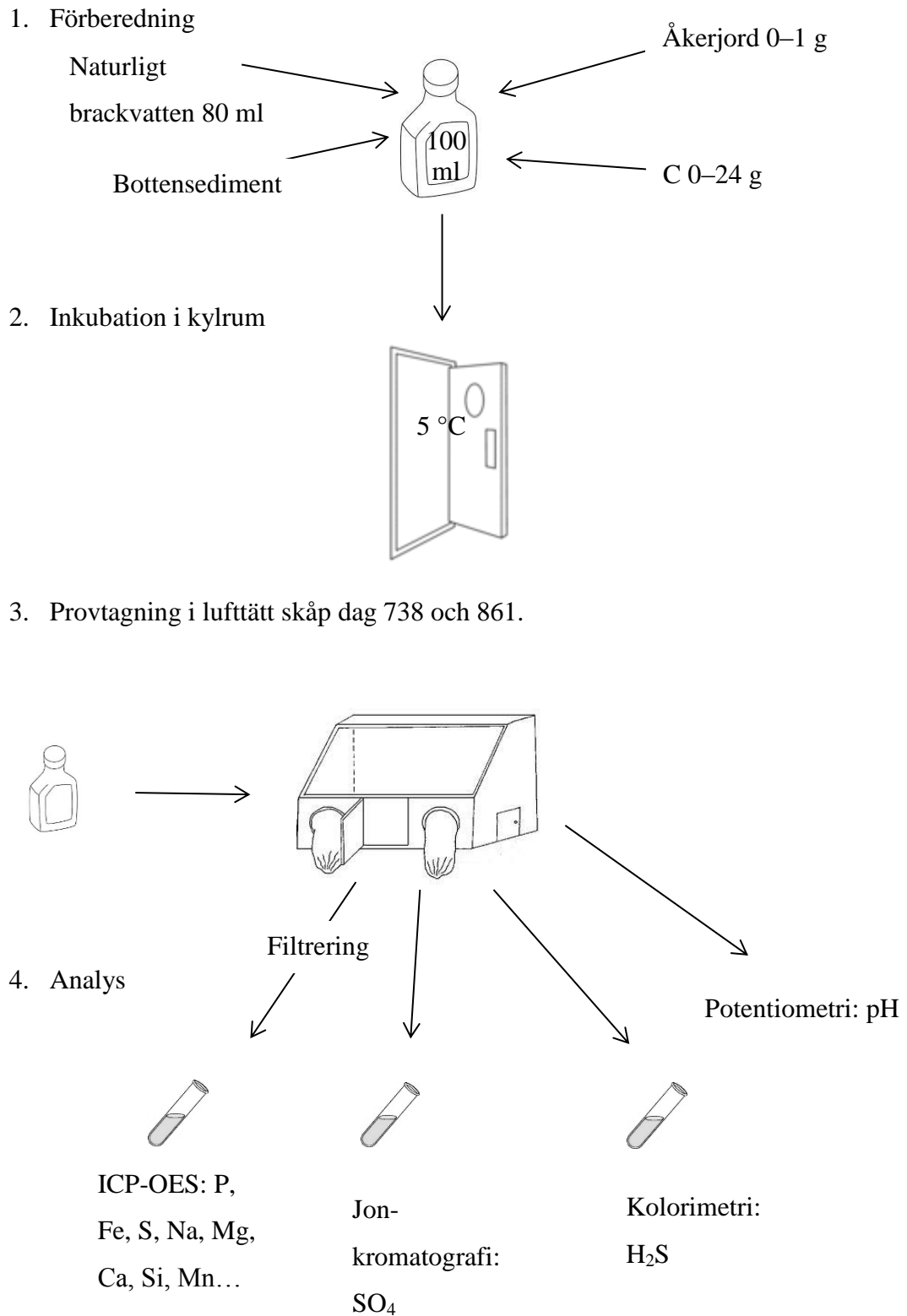


4. Analys

Ferrozinanalys:  
 $\text{Fe}^{2+}$

Fotometri: totalt  
löst fosfor

Figur 3 Håkansböleexperimentet med syntetiskt brackvatten med hög  $\text{SO}_4$ -halt. Dag 308 mättes även  $\text{SO}_4$ , totalt Fe,  $\text{NH}_4\text{-N}$ , löst organiskt C (DOC) och pH (webadresser till använda bilder, se sid 77).



Figur 4 Vikexperimentet med naturligt brackvatten som lösning (webadresser till använda bilder, se sid 77).

### 3.5 Statistiska metoder

Mätresultaten analyserades med flervariabel regressionsanalys enligt minstakvadrat-metoden med hjälp av programmet SAS (9.3).

Den linjära regressionsmodellen lyder:

$$Y_j = \beta_0 + \beta_1 x_{j1} + \beta_2 x_{j2} + \dots + \beta_p x_{jp} + \varepsilon_j, j = 1, 2, \dots, n, \quad (10)$$

där  $Y$  är den oberoende variabeln eller responsvariabeln,

$x_1, x_2, \dots, x_p$  är oberoende variabler (förklaringsvariabler),

$\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_p$  är parametrarna och

$\varepsilon$  är en slumpterm.

Fosforfrigörelsen per jordvikt modellerades med formen:

$$P = P_J + P_C \quad (11)$$

där  $P_J$  representerar jordens bidrag till P-frigörelsen och  $P_C$  C:s bidrag.

Vid modelleringen av C:s inverkan i experimentet drogs en parallell till den biokemiska syreförbrukningen. Biokemisk syreförbrukning (*Biochemical Oxygen Demand*, BOD) är den mängd syre som behövs för att bryta ner en viss mängd organiskt material och beskriver mängden av biologiskt nedbrytbart material. Nedbrytningen av organiskt material ( $L$ ) kan approximeras med första ordningens kinetik:

$$\frac{dL}{dt} = -kL \quad (12)$$

I integrerad form:

$$Lt = L_0 e^{-kt} \quad (13)$$

Alltså:

$$BOD_t = L_0(1 - e^{-kt}), \quad (14)$$

där

$BOD_t = BOD$  vid tidpunkt  $t$

$L_t = BOD$  vid tidpunkt  $t$

$L_0 = BOD$  vid tidpunkt  $t = 0$

$k$  = reaktionshastighetskonstanten

$t$  = inkubationstiden.

Ekvation X ersattes med

$$P_C = P_{Cmax}(1 - e^{-kC}), \quad (15)$$

där  $P_{Cmax}$  (maximum för C:s bidrag till P-frigörelsen) och  $k$  är parametern som söks och  $C$  är C-mängden. Funktionen har sitt maximum då  $C$  går mot oändligt. Sitt minimum ( $P_C = 0$ ) har funktionen då  $C$  är noll.

Hela regressionsmodellen lyder då:

$$P = P_J + P_{Cmax}(1 - e^{-kC}) \quad (16)$$

Även regressionsmodeller av Michaelis-Menten -typ provades. Den specifika metabolismhastigheten kan approximeras i följande modifikation av Michaelis-Mentens ekvationen (Canfield *et al.* 2005, s. 31):

$$V = V_{\max} \left[ \frac{S_D}{K_{mD} + S_D} \right] \left[ \frac{S_A}{K_{mA} + S_A} \right], \quad (17)$$

Där  $S$  är substratkoncentrationen och  $D$  och  $A$  representerar elektrondonatorer respektive elektronacceptorer.  $K_m$  är Michaelis-Menten-konstanten och anger substratkoncentrationen vid halva maximumhastigheten ( $v_{\max}/2$ ) (Canfield *et al.* 2005, s. 30).

Eftersom  $\text{SO}_4$ -koncentrationen i början var samma i alla prover och sulfatreduktionshastigheten är ungefär konstant vid koncentrationer över ca 3 mM  $\text{SO}_4$  (Boudreau & Westrich 1984; Roden & Tuttle 1993) togs inte  $\text{SO}_4$ -koncentrationen med i beräkningarna. Den Michaelis-Menten-liknande modellen blir:

$$P = P_J + P_{Cmax} \cdot \frac{C}{k_1 + C} \quad (18)$$

och om jorden betraktas som substrat för järnreduktion:

$$P = P_J + P_{C,Jmax} \cdot \frac{C}{k_1 + C} \cdot \frac{J}{k_2 + J} \quad (19)$$

Flera olika linjära och icke-linjära modeller provades för jordens påverkan.

För att jämföra modellernas duglighet användes Nash-Sutcliffes effektivitetsindex ( $E_f$ ) (Nash & Sutcliffe 1970):

$$E_f = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (\widehat{Y}_i - Y_i)^2}{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2} \quad (20)$$

där  $\widehat{Y}_i$  = det simulerade värdet,

$Y_i$  = det observerade värdet,

$\bar{Y}$  = medeltalet av de observerade värdena och

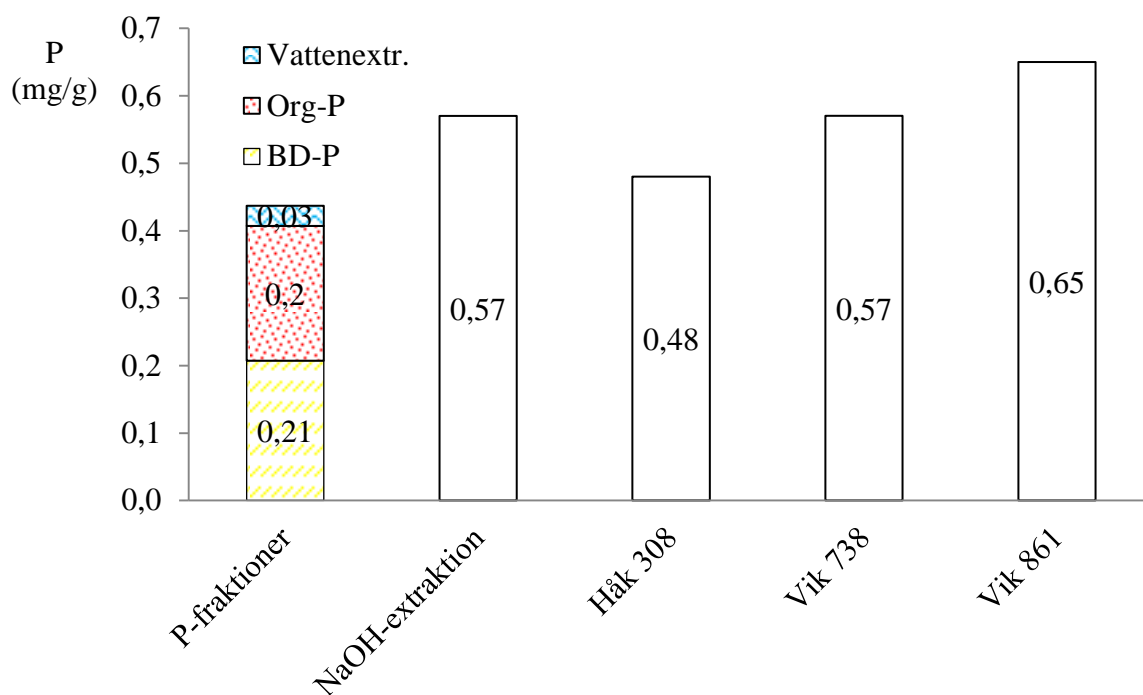
$n$  = antalet observationer.

$E_f$  får värden mellan  $-\infty$  och 1, där 1 innebär en perfekt passform.  $E_f$  utvecklades för att mäta hydrologiska modellers duglighet, men kan också användas som komplement vid utvärdering av statistiska modeller (McCuen *et al.* 2006).

## 4 Resultat

### 4.1 Fosforfrigörelsen

Upp till 0,65 mg/g P frigjordes i Vikexperimentet, alltså 44 % av jordens totala P-innehåll och 0,48 mg/g i Håkansböle (Figur 5). Resultaten i sin helhet finns i Bilaga 1.



Figur 5 Det frigjorda P-värdet jämfört med några P-fraktioner och P från upprepad NaOH-extraktion.

De icke-redoxkänsliga ämnena hade inte påverkats mycket av C-tillsatsen, förutom P (Tabell 8). Med C frigjorde 1 g jord fyra gånger mera P än den gjorde utan C.

Kontrollprovet gav 0,04 mg/l P, men eftersom det tidigare visat noll i tre parallellprover (Bilaga 1), antogs det i beräkningarna vara noll även i den andra provtagningen. Möjligheten finns dock att felet inte var slumpmässigt utan systematiskt och således påverkat alla P-värden, eller att den första ICP-OES-analysen varit mindre lyckad.



Tabell 8 De icke-redox-känsliga ämnena (experiment Vik<sub>861</sub>).

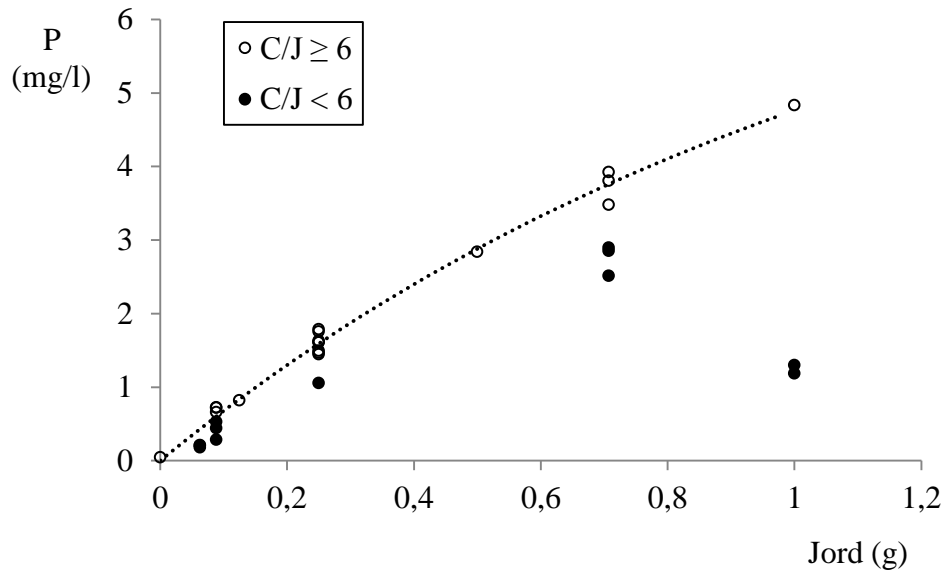
Jord	C	Al	Ca	K	Na	P	Si
(g)	(mg)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)
0	0	0,003	67	47	830	0,04	1,4
0,06	0	0,003	69	46	849	0,19	1,9
0,06	0,75	0,002	68	49	956	0,20	1,6
1,00	0	0,003	87	39	837	1,24	4,0
1,00	12	0,004	74	37	853	4,83	3,3

De redox-känsliga ämnena har däremot påverkats märkbart av C-tillsatsen (Tabell 9). Mangan följer ungefär samma tendenser som Fe, men i mycket mindre skala, varför endast Fe behandlas noggrannare.

Tabell 9 De redox-känsliga ämnena och pH (Vik<sub>861</sub>).

Jord	C	Fe	Mn	H <sub>2</sub> S	SO <sub>4</sub>	pH
(g)	(mg)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	
0	0	0,01	0,01	0,00	320	7,9
0,06	0	0,41	0,12	0,00	320	7,6
0,06	0,75	0,01	0,14	0,00	320	7,8
1,00	0	5,73	1,54	0,00	315	7,4
1,00	12	0,04	0,45	0,13	6	8,2

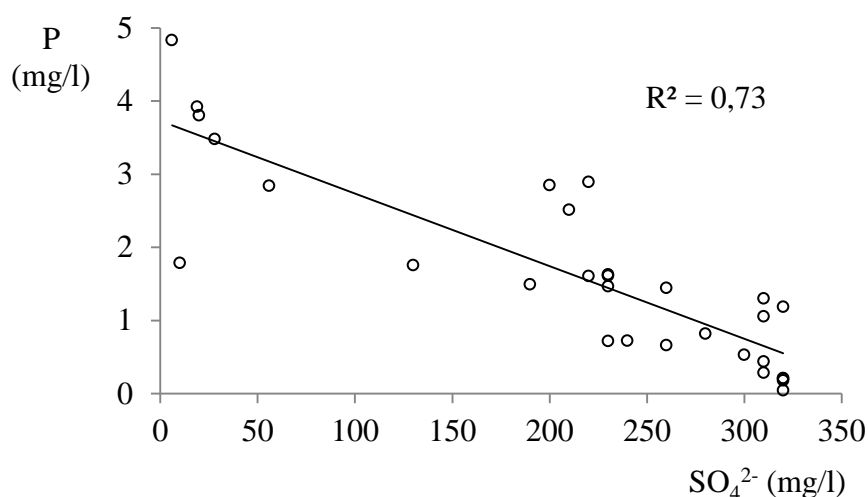
Acetatet ökade P-frigörelsen: när förhållandet mellan C och åkerjord (C/J) var lågt frigjordes mindre P (Figur 6).



Figur 6 P-koncentrationerna som funktion av jorden (Vik<sub>861</sub>). Proverna med hög C/J-kvot ligger på en linje. Proverna med låg C/J-kvot uppnår dock inte lika stor P-frigörelse.

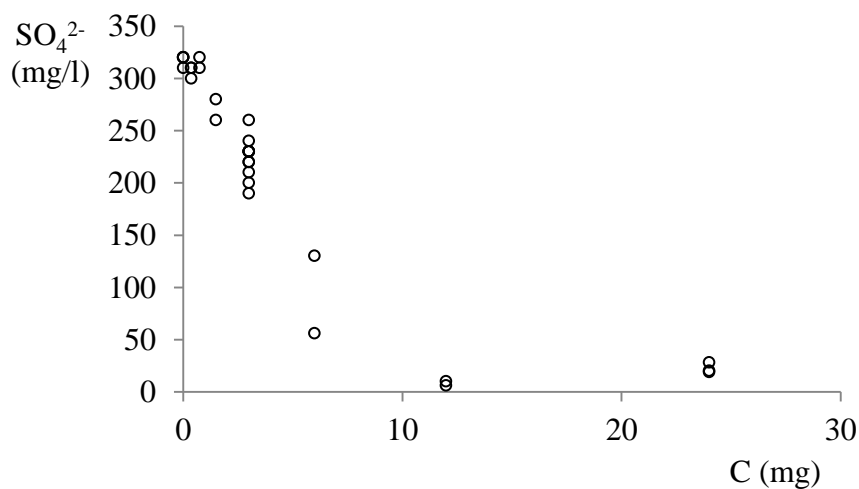
## 4.2 Sulfatminskning

Båda experimenten visade en negativ korrelation mellan  $\text{SO}_4^-$  och  $\text{PO}_4^-$  koncentrationer (Figur 7). Ju mindre  $\text{SO}_4$ , desto mera P innehöll proverna. Sambandet tyder antagligen på att  $\text{SO}_4$  reducerats till  $\text{H}_2\text{S}$  och fällt ut Fe, vilket resulterat i P-frigörelse.



Figur 7 Koncentrationen av P som funktion av  $\text{SO}_4$ -koncentrationen (Vik<sub>861</sub>).

Acetattillsatsen hade bidragit till  $\text{SO}_4$ -minskningen (Figur 8). Även åkerjorden bidrog till  $\text{SO}_4$ -minskningen (kapitel 4.5 om regressionsmodeller).



Figur 8 Sulfat som funktion av C (Vik<sub>861</sub>).

Även om jorden hade en bidragande verkan till  $\text{SO}_4$ -minskningen, var  $\text{SO}_4$ -minskningen obetydlig i proverna utan C. I prov 28 (1 g jord, 0 C) hade  $\text{SO}_4$ -koncentrationen visserligen minskat med 10 mg/l, men i motsvarande prov med C-tillsats (prov 17) hade koncentrationen minskat med 314 mg/l (Tabell 9).

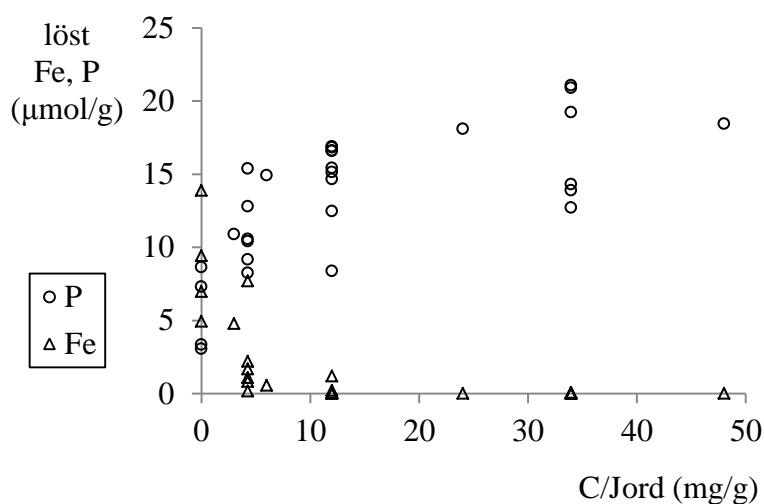
Åkerjorden, som i början var brun, ändrade färg beroende på C-mängden. I Vikserien hade proverna med under 1 mg C tillsatt brun färg medan proverna med över 1 mg C var svartfärgade. I Håkansböleserien var alla sediment svarta utom nollproverna (Figur 9).



Figur 9 Fotografier på prover från Håkansböleserien: till vänster 13E och 13D med 1 g jord och 0 gram C och till höger 11C och 12C med 0,71 g jord och över 24 g C (fotografi Jouni Lehtoranta).

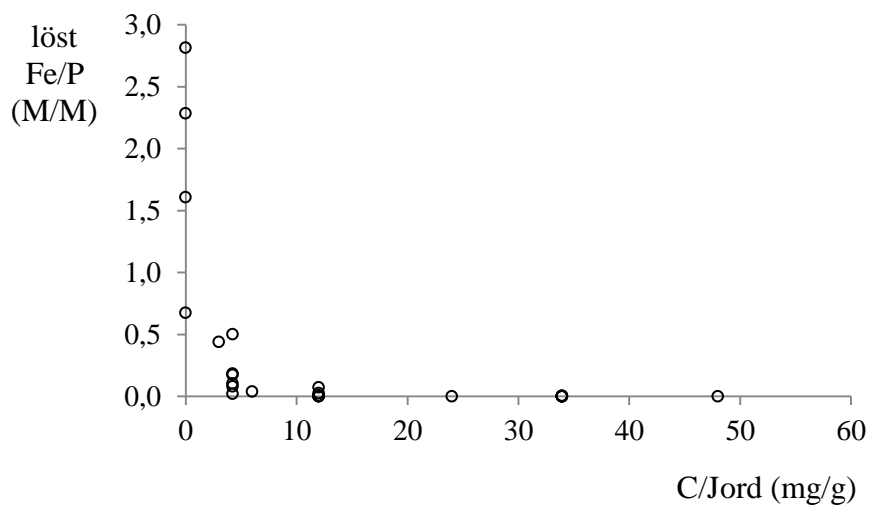
#### 4.3 Minskning av löst järn

Med ökat C/jord-förhållande sjunker koncentrationerna löst Fe, medan det lösta P ökar (Figur 10). Acetatet har möjliggjort järn- och sulfatreduktion, varvid det lösta Fe fällts ut i sulfidform, oförmögen att längre binda P, med ökad P-frigörelse som följd.



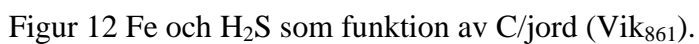
Figur 10 Löst Fe och P som funktion av C/jord (Vik<sub>861</sub>).

Det molära förhållandet av löst Fe och P varierade från 0 till 2,8. Ju högre C/jord, desto mindre var Fe/P och desto större var följaktligen P-frigörelsen (Figur 11).



Figur 11 Det molära förhållandet Fe/P som funktion av C/jord (Vik<sub>861</sub>).

Vätesulfid ökade med ökat C/jord-förhållande (Figur 12). Vätesulfid ansamlades i prover med C/jord  $\geq 6$ .



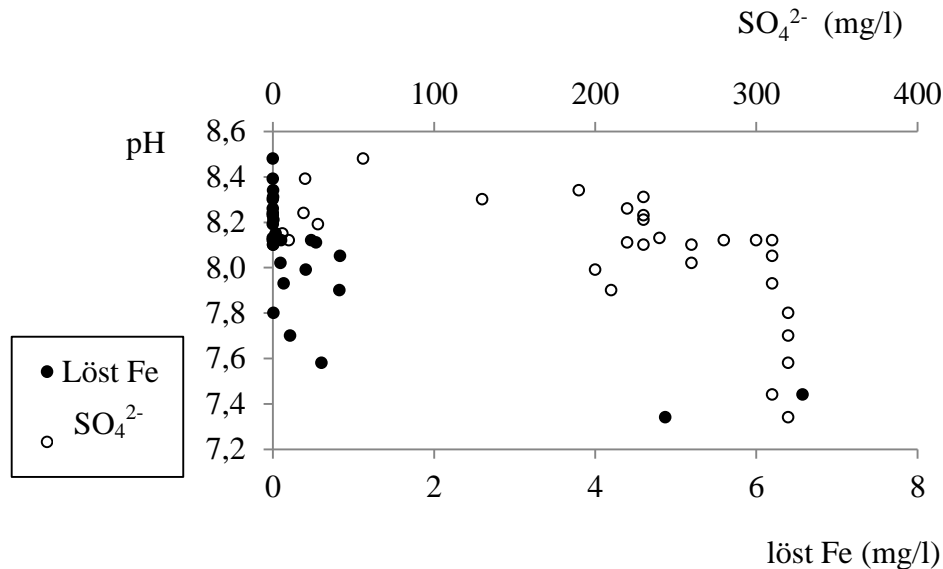
I Vikexperimentet utgick pH från 8,1. När blankprovets pH mättes under provtagningen dag 861 var det 7,9. De övriga provernas pH-värden hade både sjunkit och höjts och fördelade sig normalt inom intervallet 7,3–8,5.

A scatter plot showing the relationship between pH (Y-axis) and P (mg/g) (X-axis). The X-axis ranges from 0 to 0,8 with major ticks every 0,2. The Y-axis ranges from 7,2 to 8,6 with major ticks every 0,2. There are 20 data points plotted as open circles. The data shows a general positive correlation, with pH increasing as P increases, though with some scatter at higher P values.

P (mg/g)	pH
0,08	7,32
0,08	7,45
0,22	7,70
0,25	7,58
0,25	7,80
0,25	8,12
0,28	7,88
0,32	8,00
0,32	8,05
0,32	8,10
0,35	8,05
0,38	7,92
0,38	8,18
0,38	8,20
0,42	8,40
0,45	8,02
0,45	8,25
0,45	8,50
0,48	8,05
0,48	8,15
0,48	8,35
0,52	8,10
0,52	8,28
0,55	8,10
0,55	8,30
0,58	8,10
0,65	8,12
0,65	8,15
0,65	8,22

Figur 13 pH som funktion av P (Vik<sub>861</sub>).

Ju mindre  $\text{SO}_4$  och Fe i lösningen, desto högre är pH, vilket antyder pH-höjande mikrobiell sulfat- och järnreduktion med Fe-sulfidutfällning (Figur 14).



Figur 14 pH som funktion av koncentrationerna av  $\text{SO}_4$  och löst Fe (Vik<sub>861</sub>).

#### 4.5 Förklaring till fosforfrigörelsen

Flera olika modeller testades för desorptionstermen, både linjära ( $a + k \cdot J$ ), logaritmiska ( $a + \ln J$ ), exponentiella ( $e^{-k \cdot J}$  och  $J^k$ ). Linjära former passade bäst på de två första Håkansåkerprovserierna och  $e^{-k \cdot J}$  passade bäst på resten. Eftersom den okända C-tillsatsen i Håk<sub>196</sub> och Håk<sub>308</sub> var proportionerlig mot den ursprungliga, påverkar den endast  $k_2$ -värdet framför C-faktorn. Regressionsanalysen ger ett ”för högt”  $k_2$  för att kompensera för utebliven höjning av C, varför hela exponenten kan skrivas som  $-k_2/x \cdot C$  respektive  $-k_2/y \cdot C$ , där  $x$  och  $y$  representerar de okända C-tillsatserna. Det påverkar inte modellens användbarhet i att bestämma ( $P_{max}$ ), jämföra observerat och anpassat  $P$  (Figur 17) eller undersöka residualerna (Bilaga 2). I Håkansböleserien stiger anpassningsnivån från den första till den tredje provserien. Funktionernas maxima ökar dock inte (Tabell 10). Vikseriens funktioner har högre maxima.

Tabell 10 Regressionsekvationer för P-frigörelsen enligt ”BOD-liknande” modell.

Experiment	Fosforfrigörelsen $P$ (mg/g), $J \neq 0$	$J \rightarrow 0, C \rightarrow \infty$ $(P_{max})$	$E_f$
Håk <sub>141</sub>	$P = 0,19 - 0,19 \cdot J + 0,28 \cdot (1 - e^{-0,5 \cdot C})$	0,47	0,78
Håk <sub>196</sub>	$P = 0,12 - 0,10 \cdot J + 0,28 \cdot (1 - e^{-1,1/x \cdot C})$	0,40	0,89
Håk <sub>308</sub>	$P = 0,22 \cdot e^{-1,4 \cdot J} + 0,25 \cdot (1 - e^{-4,8/y \cdot C})$	0,47	0,97
Vik <sub>738</sub>	$P = 0,27 \cdot e^{-3,2 \cdot J} + 0,33 \cdot (1 - e^{-1,5 \cdot C})$	0,61	0,90
Vik <sub>861</sub>	$P = 0,34 \cdot e^{-2,1 \cdot J} + 0,35 \cdot (1 - e^{-0,6 \cdot C})$	0,70	0,83

Även modeller av Michaelis-Menten-typ testades där  $C$  betraktades som substrat. Sulfatet förbisågs eftersom dessa höga koncentrationer inte inverkar på sulfatreduktionshastigheten (Boudreau & Westrich 1984; Roden & Tuttle 1993) och termen därför är ungefär konstant och inkluderas i täljarkoefficienten. En inkludering av jordens medverkan som substrat gav inte nämnvärt bättre anpassning och visas inte här. Provserierna Håk<sub>196</sub> och Håk<sub>308</sub> är inte med här eftersom det inte går att beskriva hur en okänd  $C$ -mängd påverkar nämnaren  $k_3 + C$ . Funktionens maximum nås när  $C$  går mot oändligt och  $J$  går mot noll.



Tabell 11 "Michaelis-Menten -liknande" regressionsmodeller.

Experiment	Fosforfrigörelsen $P$ (mg/g), $J \neq 0$	$J \rightarrow 0, C \rightarrow \infty (P_{\max})$	$E_f$
Håk <sub>141</sub>	$P_{141} = 0,20 - 0,20 \cdot J + \frac{0,33 \cdot C}{1,7 + C}$	0,53	0,76
Vik <sub>738</sub>	$P_{738} = 0,28 \cdot e^{-3,2 \cdot J} + \frac{0,37 \cdot C}{0,50 + C}$	0,65	0,92
Vik <sub>861</sub>	$P_{861} = 0,34 \cdot e^{-2,1 \cdot J} + \frac{0,40 \cdot C}{1,2 + C}$	0,73	0,81

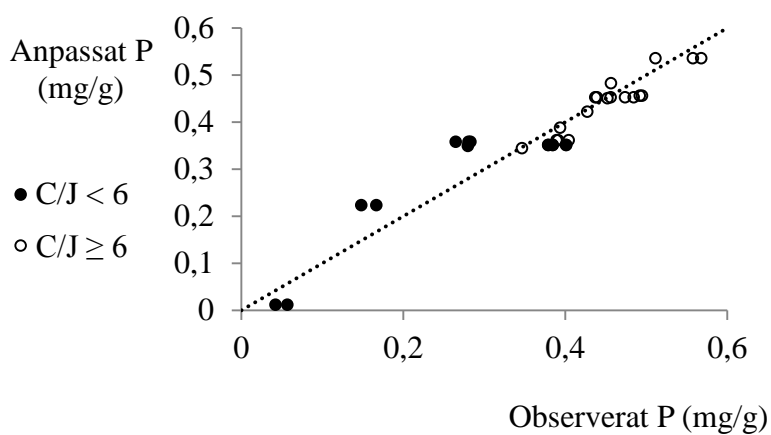
Den Michaelis-Menten-inspirerade modellen gav högre maximumvärden för  $C$ :s bidrag och därmed steg hela ekvationens maxima. Jordtermen var nästan identisk. Anpassningen var nästan lika bra, endast Vik<sub>738</sub> fick ett bättre  $E_f$ -värde.

Både  $J$ :s och  $C$ :s maximala bidrag till  $P$  steg från Håk<sub>141</sub> till Vik<sub>738</sub> och Vik<sub>861</sub> (Tabell 12).  $C$ :s procentuella andel av  $P$  sjönk dock medan jordens procentuella andel av  $P$  steg.

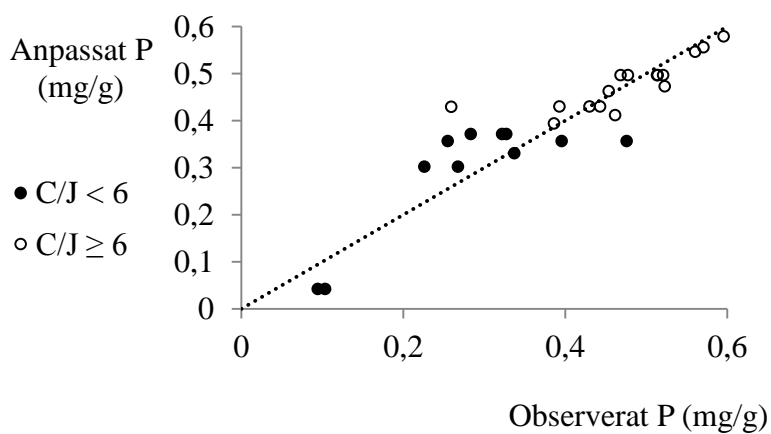
Tabell 12  $J$ :s och  $C$ :s andelar i den "BOD-liknande" modellen.

Provserie	$J \rightarrow 0, C = 0$	$J \rightarrow \infty, C \rightarrow \infty$	$J \rightarrow 0, C \rightarrow \infty$	$J_{\max}/P_{\max}$	$C_{\max}/P_{\max}$
	$J_{\max}$ (mg/g)	$C_{\max}$ (mg/g)	$P_{\max}$ (mg/g)	%	%
Håk <sub>141</sub>	0,19	0,28	0,47	0,41	0,59
Vik <sub>738</sub>	0,27	0,33	0,61	0,45	0,55
Vik <sub>861</sub>	0,34	0,35	0,70	0,49	0,51

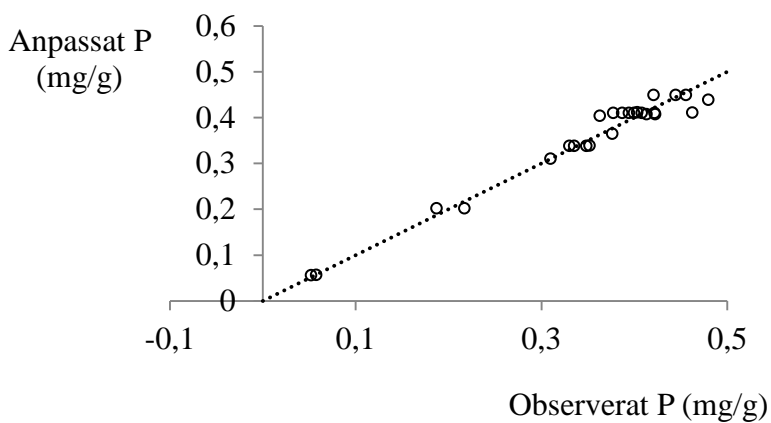
Figur 15–17 visar att modellens förklaringsgrad förbättras med stigande  $C$ . I Håk<sub>308</sub> (Figur 17) ligger de observerade och de anpassade värdena nästan helt på linje.



Figur 15 Vik<sub>738</sub>,  $P = 0,27 \cdot e^{-3,2 \cdot J} + 0,33 \cdot (1 - e^{-1,5 \cdot C})$ .



Figur 16 Vik<sub>861</sub>,  $P = 0,34 \cdot e^{-2,1 \cdot J} + 0,35 \cdot (1 - e^{-0,6 \cdot C})$ .



Figur 17 Håk<sub>308</sub>.  $P = 0,22 \cdot e^{-1,4 \cdot J} + 0,25 \cdot \left(1 - e^{-4,8 \cdot \frac{C}{y}}\right)$ . Modellens förklaringsgrad förbättras betydligt efter C-tillsatsen.

Regressionsmodellen för  $\text{SO}_4$ -koncentrationen visar att både jorden och C minskat  $\text{SO}_4$ . Acetatet har bidragit till pH-höjning medan jorden haft en pH-sänkande verkan (Tabell 13).

Tabell 13 Regressionsmodell för  $\text{SO}_4$ -koncentrationen (mM) och pH.

Experiment	$\text{SO}_4^{2-}$ (mM) och pH	$E_f$
Håk <sub>308</sub>	$\text{SO}_4^{2-}(\text{mM}) = 25,3 - 3,0 \cdot J - 11,5 \cdot (1 - e^{-0,16 \cdot C/y})$	0,67
Vik <sub>861</sub>	$\text{SO}_4^{2-}(\text{mM}) = 3,53 - 0,27 \cdot J - 3,39 \cdot (1 - e^{-0,16 \cdot C})$	0,95
Vik <sub>861</sub>	$\text{pH} = 7,82 - 0,35 \cdot J + 0,65 \cdot (1 - e^{-0,44 \cdot C})$	0,65

## 5 Diskussion

Genom att inkubera åkerjord i brackvatten med acetat och sedimentmikrober lyckades man starta mikrobprocesser som sker i havssediment. Svartnade sediment och lukt av  $H_2S$  tyder på att mikroberna varit aktiva.

### 5.1 Mikrobiella processer ökar fosforfrigörelsen

I det 861 dagar långa Vikexperimentet frigjordes upp till 0,65 mg/g P (44 % av jordens P) (Figur 5). Det högsta värdet är tre gånger högre än det BD-P (0,21 mg/g), och adderat till det organiskt bundna P och det adsorberade P förblir värdet ändå under 0,5 mg/g. Det P som experimentet frigjort motsvarar snarare det P som erhöles genom upprepad NaOH-extraktion (0,57 mg/g) och som har antagits omfatta även icke-reaktivt P (Lukkari *et al.* 2008). Dessa resultat antyder att BD inte extraherar P från alla reducerbara Fe-oxider.

Fosforfrigörelsen sker via flera mekanismer. För det första har lätt adsorberat P desorberats från jordpartiklarna när det kommit i kontakt med vatten (Sharpley *et al.* 1981). Vattenextraktion (1:100) gav 0,03 mg P/g jord. Vid sidan om den snabba desorptionen (minuter till timmar) förekommer en långsam desorption (dagar till månader) av P från metalloxiders innanmäte (Froelich 1988). Regressionsmodellernas ”jordtermer” växer med tiden (Tabell 10–11), vilket kan tyda på långsam desorption. För det andra kan en viss mineralisering av jordens organiska material ha skett, varvid organiskt bundet P samtidigt frigjorts. Andelen organiskt bundet P i åkerjorden uppskattades vara 0,2–0,25 mg/g, men antagligen har inte allt organiskt bundet P frigjorts eftersom en del av P är bundet till ytterst svårnedbrytbart organiskt material (Lukkari *et al.* 2008).

Fosforfrigörelsen gynnades av C-tillsatsen (Tabell 8 & Tabell 10–11). I Vikexperimentet förmådde 1 g jord frigöra fyra gånger mera P med C än utan C under anaeroba förhållanden. Acetatjonen kan, i egenskap av anjon, ha konkurrerat med P om sorptionsställen (om organiska anjoners konkurrens, se t ex Froelich 1988). Även pH korrelerar med P-frigörelsen (Tabell 13), vilket dels kan förklaras med att pH-

höjning gynnar P-desorption (t ex Hingston *et al.* 1967). I experimentets början var pH 8,1 och varierade i slutet av experimentet mellan 7,3 och 8,5. Acetatjonen är svagt basisk ( $pK_b \approx 9,3$ ), och kan genom direkt pH-höjande verkan ha ökat P-desorptionen. Även indirekt har acetat antagligen bidragit till pH-höjning genom att fungera som substrat för den pH-höjande järn- och sulfatreduktion som diskuterat i kapitel 2.3.4 (Lamers *et al.* 1998; Soetaert *et al.* 2007; Ben-Yaakov 1973; Boudreau & Canfield 1993). Minskat  $SO_4$  och löst Fe korrelerade med förhöjt pH, vilket tyder på pH-höjande Fe-sulfidutfällning (Figur 14). Eftersom pH inte mättes efter tillsatsen NaAc går det inte att avgöra i vilken utsträckning de två faktorerna påverkat pH. Den negativa korrelationen mellan pH och åkerjorden (Tabell 13) beror antagligen på åkerjordens surhet och dess buffrande verkan. I Håkexperimentet höjdes pH till anmärkningsvärt höga värden över 10, vilket kan bero på de höga C-tillsatserna.

I Vikexperimentet har  $SO_4$  minskat från 320 mg/l till 6 mg/l (Tabell 9) och i Håkansböle från 2400 mg/l till 213 mg/l (Bilaga 1). Den kraftigare  $SO_4$ -minskningen i Håkansböle hade dock inte ökat P-frigörelsen.

En liten del av  $SO_4$  har antagligen upptagits assimilativt av mikroorganismerna för celluppbyggnad. Sulfat bildar salt med flera katjoner såsom  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Fe^{2+}$  och  $Fe^{3+}$ . Na-koncentrationerna ökade upp till hälften i och med  $Na_2SO_4$ -tillsatsen och åkerjorden bidrog med extra Ca. Trots att tillsats av en gemensam komponent minskar salters löslighet, är det ändå osannolikt att  $SO_4$  skulle ha fällts ut på grund av tillsatsen, eftersom båda salternas löslighetsprodukter är stora:  $K_{sp}(Na_2SO_4) \approx 10$  respektive  $K_{sp}(CaSO_4) \approx 9 \cdot 10^{-6}$ .

Sulfathalterna korrelerade negativt linjärt med P-frigörelsen (Figur 7). Även Roden och Edmonds (1997) observerade ett linjärt samband mellan  $SO_4$ -tillsats och P-frigörelse i ett experiment där  $SO_4$ -halten varierades (i detta experiment var utgångskoncentrationen lika i alla prover). Eftersom  $SO_4^{2-}$  i egenskap av anjon tävlar med P om sorptionsställen, kan  $SO_4$  ha bidragit till P-desorption (Hawke *et al.* 1989; Caraco *et al.* 1989), vilket skulle ha bytt ut en del av lösningens  $SO_4$  mot P. Regressionsekvationen för  $SO_4$ -koncentrationen (Tabell 13) visar att åkerjorden bidragit till  $SO_4$ -minskningen, vilket kan tala för anjonutbyte. En obetydlig

SO<sub>4</sub>-minskning i proverna utan C (Tabell 9) antyder dock att C har varit avgörande för SO<sub>4</sub>-minskningen, och inte anjonutbyte med P. Uppmätta H<sub>2</sub>S-halter (Bilaga 1) och en tydlig lukt av H<sub>2</sub>S vid provtagningen vittnar om dissimilatorisk sulfatreduktion. Det svartnade sedimentet i C-innehållande flaskor (Figur 9) tyder på Fe-sulfidutfällning (Fanning *et al.* 1993).

Medan en ökad C/jord-kvot har ökat P-frigörelsen, har det samtidigt minskat det lösta Fe (Figur 10), vilket antyder en högre mikrobaktivitet med ökad H<sub>2</sub>S-bildning och Fe-sulfidutfällning som följd. Motsvarande sjunker lösningens Fe/P-förhållande med stigande C/jord (Figur 11).

Acetatet har varit avgörande för frigörelsen av P genom att erbjuda C-källa och elektronavgivare för dissimilatorisk järn- och sulfatreduktion. Att C-källan använts för mikrobiologisk aktivitet märks genom att den påverkat de redox-känsliga ämnena avsevärt mera än de redox-okänsliga (Tabell 8–9). Fosfor har påverkats trots sin redox-okänslighet. Det förklaras med att de P-bindande Fe(III)-oxiderna reducerats och fällts ut som Fe(II)-sulfider, vilka är oförmögna att binda P. Belastningen av organiskt material, vilken kännetecknar eutrofierade vatten, ökar således P-frigörelsen ur erosionspartiklar i SO<sub>4</sub>-haltiga miljöer. Dessutom kan organiskt material hindra kristalliseringen av amorfa Fe-hydroxider till mer svårreducerbara former (Schwertmann 1966).

## 5.2 Mikrobiellt frigörbar fosfor

Regressionsmodellens maximum växer inte vid ökad C-tillsats, men modellen ger allt bättre anpassning. Det verkar som det finns ett bestämt värde för det mikrobiellt utvinnbara P som uppnås när C överskrider ett visst gränsvärde. Den mikrobstyrd P-frigörelsen når då sitt fulla potential. Vid höga C-värden räcker *J*-variabeln för att predicera P-frigörelsen tillfredsställande ( $E \approx 0,60$  om man inte räknar med nollproverna). Denna metod kunde med fördel användas för att bestämma det mikrobiellt frigörbara P.

Fosforfrigörelsen är inte linjär, utan saktar in vid högre koncentrationer (Figur 6). Det kan bero på att P dels adsorberas till flaskans yta i allt större grad, dels upptas av ökat antal mikrober.

### 5.3 Järnreduktion inhiberar inte sulfatreduktion

De uppmätta  $\text{H}_2\text{S}$ -halterna är antagligen underskattade, eftersom man inte såg till att förhindra utgasning vid provtagningen, varför  $\text{H}_2\text{S}$ -värdena bör betraktas som undre gränser. Vätesulfidkoncentrationer från 0,13 mg/l (4  $\mu\text{M}$ ) till 50 mg/l (1,5 mM) uppmättes i de flesta prover där kvoten mellan C och jord (C/jord) är minst 6 (Figur 12). Eftersom  $\text{H}_2\text{S}$  inte ackumuleras över 1  $\mu\text{M}$  i närvaro av reaktiva Fe-oxider, ens under aktiv sulfatreduktion (Canfield 1989), har de reaktiva Fe-oxiderna antagligen inte räckt till för Fe-sulfidutfällning i proverna med för mycket  $\text{H}_2\text{S}$  i förhållande till jord. Ferrihydritytan har en begränsad mängd reaktionsställen för bildning av sulfidkomplex, och om dessa mätas på  $\text{H}_2\text{S}$  stannar Fe-sulfidbildningen upp (Poulton *et al.* 2003). Uppmätta  $\text{Fe}^{2+}$ -halter tyder på motsvarande på begränsad sulfatreduktion, eftersom  $\text{Fe}^{2+}$  inte förekommer vid närvaro av  $\text{H}_2\text{S}$ , utan fälls ut i sulfidform (Chapelle *et al.* 2009). Sulfatreduktionen har således dominerat vid höga C/jord-kvoter och järnreduktionen vid låga kvoter.

Resultaten antyder dock inte att åkerjorden som Fe-oxidkälla skulle ha inhiberat sulfatreduktionen, utan snarare tvärtom: åkerjorden har gynnat sulfatreduktionen (Tabell 11–12) när den kombineras med C-tillsats. Vid C/J minst 6 minskar  $\text{SO}_4$  stadigt med ökade jordhalter, men vid C/J under 6 bidrar jorden mindre till  $\text{SO}_4$ -minskningen. Eftersom  $\text{SO}_4$  inte minskar utan C-tillsats är det antagligen åkerjordens Fe-oxider som svarar för minskningen. Det är dock även möjligt att tillsatsen av lättillgängligt C möjliggjort användningen av jordens mera svårtillgängliga C-innehåll (Madigan *et al.* 2009, s. 712) och således ökat jordens positiva inverkan på sulfatreduktionen.

Acetatnivåerna i experimentet har antagligen varit för höga för att de järnreducerande bakterierna skulle kunna utkonkurrera de sulfatreducerande bakterierna genom att hålla nere substratnivåerna (Lovley 1991). Eftersom experimentflaskorna var slutna

har den bildade  $\text{H}_2\text{S}$  tillåtit ackumulera och antagligen inhiberat själva sulfatreduktionen, både genom att sänka reaktionens termodynamiska lönsamhet (ekvation 2) och genom sin giftighet (Reis *et al.* 1992). Experimentets  $\text{H}_2\text{S}$ -halter (max 1,5 mM) har antagligen inte ändå varit så stora att de skulle ha inhiberat tillväxten fullkomligt. Total inhibition av mikrotillväxt krävde 16 mM i pH 5,8–7 (Reis *et al.* 1992). Järnet har genom att fälla ut  $\text{H}_2\text{S}$  underlättat fortsatt sulfatreduktion. Under naturliga förhållanden tillåts dock  $\text{H}_2\text{S}$  åtminstone till en viss grad diffundera bort och avlägsnas utan att Fe-sulfidutfällning behöver ske. Resultaten utesluter således inte möjligheten att Fe-oxiderna i erosionsmaterial kan inhibera sulfatreduktion som föreslaget av Ekholm och Lehtoranta (2012).

Motsvarande kan  $\text{H}_2\text{S}$  underlätta järnreduktionen genom att fälla ut hindrande Fe(II)-fällningar (Roden 2006), såsom Fe(II)-Fe(III)-faser (Hyacinthe & Van Cappellen 2004) och sideritbeläggningar (Roden & Zachara 1996; Hacherl *et al.* 2003) från Fe(III)-oxidernas ytor, och således öka P-frigörelsen. In situ-experiment har visat att ökad salinitet ökar Fe-oxiders biotillgänglighet, möjligen via nämnda mekanism (Weston *et al.* 2006). I proverna med C/jord högst 4 uppmättes löst (och kolloidalt) Fe, vilket antyder att sulfatreduktionen inte producerat tillräckligt  $\text{H}_2\text{S}$  för att fälla ut Fe i dessa prover. Järn- och sulfatreduktionen verkar ha gynnat varandra.

#### 5.4 Fe/P-kvotens samband med fosforfrigörelsen

Lösta Fe/P-kvoter mindre än 2 är vanliga i marina anoxiska bottenvatten, medan motsvarande kvot i sötvatten ofta är över 2. Det kan förklara de höga P-halterna i havsvatten:  $\text{SO}_4$  i havsvatten leder till  $\text{H}_2\text{S}$ -bildning med Fe-sulfidutfällning och resulterar i brist på löst Fe. De låga Fe-halterna räcker inte för att fälla ut P (Gunnars *et al.* 2002; Blomqvist *et al.* 2004). I det här experimentet hade de icke-C-innehållande proverna de högsta Fe/P-kvoterna, mellan 0,6 och 2,8, medan de C-innehållande provernas kvoter var 0–0,5. De prover som frigjort minst P per jordvikt var nollproverna och prov 1 (det lägsta jordinnehållet). Låga Fe/P-kvoter tyder antagligen på att  $\text{H}_2\text{S}$  bildats och fällt ut Fe i form av olösliga Fe-sulfider (Gunnars och Blomqvist 1997). Här är det dock inte ökade  $\text{SO}_4$ -halter som minskat



Fe/P-kvoten, utan C-halten, vilken stimulerat  $\text{H}_2\text{S}$ -bildning och Fe-sulfidutfällning med minskat Fe/P som följd.

Anschutz *et al.* (1998) har räknat ut ett teoretiskt minimivärde för Fe/P-förhållande i P-adsorberade kolloidala ferrihydritpartiklar (30 Å) på 6,7. Ju mindre partiklar, desto lägre är det minimi-Fe/P-värdet, alltså desto högre är förmågan att adsorbera P. Fe(III)-fosfatföreningar kan dock bildas vid lägre Fe/P-kvoter, 2 (Gunnars *et al.* 2002) eller bara 1–1,5 (Hyacinthe & Van Cappellen 2004). Den bikarbonat-ditionitextraherade fraktionen hade Fe/P-förhållandet 4,5, vilket antyder att en del av P varit bundet till Fe i Fe-fosfater.

## 5.5 Praktiska förslag på förbättring av experimentet

För att erhålla en anaerob miljö användes stängda flaskor. Den ackumulerade  $\text{H}_2\text{S}$  kan ha påverkat själva mikrobfloran genom sin toxicitet. För att undvika missvisande resultat från  $\text{H}_2\text{S}$ -mätningen på grund av utgasning borde provtagningen ske direkt efter att korkarna öppnats eller genom gummikorkar. Resultaten från  $\text{SO}_4$ -mätningen torde dock vara tillförlitliga eftersom provtagningen genomfördes i anaerobskåp, vilket hindrat  $\text{H}_2\text{S}$  från att oxidera tillbaka till  $\text{SO}_4$ .

För att kunna utesluta pH-verkan på P-frigörelsen borde pH buffras till ett konstant värde så man (eller låta bli att buffra, alternativt buffra med NaAc + HAc). Åtminstone borde pH mätas i början av experimentet efter alla tillsatser. Sterila parallellprover kunde användas för att åtskilja C-källans möjliga kemiska effekter från de mikrobiologiska.

I experimentdesignen borde de oberoende variablerna inte korrelera sinsemellan. Nu uppvisade de en svag korrelation.

## 6 Slutsatser

Östersjön tar emot eutrofierande P i såväl löst som partikulär form. Eutrofieringen leder till ökad produktion av organiskt material, vilket göder mikrobverksamheten i bottensedimenten. Syre konsumeras i snabbare takt och ersätts av mindre gynnsamma oxidationsmedel som Fe och  $\text{SO}_4$ . Järn- och sulfatreduktion blir mera uttalade, vilket ökar P-frigörelsen ur erosionspartiklar. Miljöer som redan är eutrofierade belastas därmed mera av partikulärt P än icke-eutrofierade miljöer.

Vårt experiment visar att dissimilatorisk järn- och sulfatreduktion kan förorsaka en omfattande frigörelse av P från åkerjordpartiklar under lång tid vid tillräckliga koncentrationer av tillgängligt organiskt C. Upp till 44 % av det totala P frigjordes på drygt två år, vilket var mera än BD-extraktion och upprepad NaOH-extraktion gav. Regressionsanalys visar att P-frigörelsen var beroende av både åkerjorden och C. Även  $\text{SO}_4$ -minskningen berodde på C, varför man kan anta att sulfatreduktion med  $\text{H}_2\text{S}$ -bildning skett. Acetatet minskade det lösta Fe, vilket tyder på Fe-sulfid-utfällning. Den omfattande P-frigörelsen beror sannolikt på att Fe som olöslig sulfid inte längre förmått binda P.

Vid låga C-halter är regressionsmodellens anpassning sämre, vilket kan bero på att olika metabolismer konkurrerar om C-källan med oförutsägbart resultat. Vid höga C-halter uppnår den mikrobiellt medierade P-frigörelsen sin fulla potential och jorden frigör upp till fyra gånger så mycket P som den förmår utan C-tillsats. Det verkar finnas ett gränsvärde för C över vilket P-frigörelsen kan förutspås enbart på basen av jordmängden.

Sulfat- och järnreduktionen understöder varandra genom att  $\text{H}_2\text{S}$  rensar Fe-oxidytan och gynnar fortsatt Fe-reduktion, medan  $\text{Fe}^{2+}$  motsvarande fäller ut inhiberande  $\text{H}_2\text{S}$  och således underlättar fortsatt sulfatreduktion. P-frigörelsen blir förutspåbar enbart på basen av jordhalten. Dissimilatorisk järnreduktion inhiberar inte nödvändigtvis sulfatreduktionen, utan de två processerna kan däremot stöda varandra, åtminstone vid riklig tillgång på substrat.

I detta experiment frigjordes mera P än BD-extraktionen gav, vilket antyder att åkerjordens Fe-oxider är mera reducerbara än man hittills antagit (Uusitalo 2004). Den använda metoden simulerar naturliga förhållanden bättre än kemiska extraheringsmetoder och kan ge en mera realistisk uppskattning om hur mycket P som verkligen kan frigöras från åkerjordpartiklar under reducerande,  $\text{SO}_4$ -rika och eutrofierande förhållanden. Dessa förhållanden är möjliga i  $\text{SO}_4$ -förorenade, eutrofierade sjöar och i eutrofierade brack- och havsvatten såsom Finska viken. Resultaten är anmärkningsvärda eftersom Finska viken mottar kraftig erosion från södra Finlands lerjordar (Turtola & Paajanen 1995).

## 6.1 Förslag till fortsatt forskning

Ett liknande experiment med lägre C-koncentrationer skulle ge en bättre bild av P-frigörelsen vid låga C-halter. Flera observationer vid låga C-koncentrationer skulle även möjliggöra en förbättring av regressionsmodellen. Med hjälp av tätare mät-punkter, i synnerhet i början, kunde man även utveckla en kinetisk modell.

Åkerjorden kunde renas från organiskt material både för att utesluta P från organiskt ursprung och för att undvika att jordens organiska material tjänar som C-källa för mikroberna. Man kunde analysera åkerjordens Fe-oxiders form i början för att bestämma koncentrationen av reducerbart Fe. Det skulle ge mycket tilläggs-information om man i slutet även analyserade åkerjordens  $\text{SO}_4$ -innehåll och Fe-sulfidfällningen för att beräkna hur mycket  $\text{SO}_4$  som reducerats. Mätning av sulfatreduktionshastigheten med hjälp av radioisotoper skulle ge en tydligare bild av sulfatreduktionens omfattning.

För att följa upp mikrobiologisk verksamhet kunde man mäta löst organiskt och oorganiskt C. Gensekvensering skulle också vara ett användbart verktyg vid kartläggning av mikrobfaunan.

Speciellt intressant skulle vara att jämföra hur mycket P olika åkerjordtyper frigör som följd av järn- och sulfatreduktion. Ett steg längre kunde vara att undersöka vilken effekt olika gödslingsmetoder och -medel har på det frigörbara P.

## 7 Källförteckning

- Anschutz, P., Zhong, S., Sundby, B., Mucci, A. & Gobeil, C. (1998). Burial efficiency of phosphorus and the geochemistry of iron in continental margin sediments. *Limnology and Oceanography*, 43(1), 53–64.
- Arndt, S., Jørgensen, B. B., LaRowe, D. E., Middelburg, J. J., Pancost, R. D. & Regnier, P. (2013). Quantifying the degradation of organic matter in marine sediments: A review and synthesis. *Earth-Science Reviews*, 123(0), 53–86.
- Beltman, B., Rouwenhorst, T. G., Van Kerkhoven, M. B., Van Der Krift, T. & Verhoeven, J. T. A. (2000). Internal eutrophication in peat soils through competition between chloride and sulphate with phosphate for binding sites. *Biogeochemistry*, 50(2), 183–194.
- Ben-Yaakov, S. (1973). pH buffering of pore water of recent anoxic marine sediments. *Limnology and Oceanography*, 18(1), 86–94.
- Berge, D. & Källqvist, T. (1990). *Biotilgjengelighet av fosfor i jordbruksavrenning. Sammenliknet med andre forurensningskilder, Sluttrapport*. Oslo: Norsk institutt for vannforskning. 130 s.
- Blomqvist, S., Gunnars, A. & Elmgren, R. (2004). Why the limiting nutrient differs between temperate coastal seas and freshwater lakes: A matter of salt. *Limnology and Oceanography*, 49(6), 2236–2241.
- Boström, B., Persson, G. & Broberg, B. (1988). Bioavailability of different phosphorus forms in freshwater systems. *Hydrobiologia*, 170(1), 133–155
- Boudreau, B. P. & Canfield, D. E. (1993). A comparison of closed- and open-system models for porewater pH and calcite-saturation state. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 57(2), 317–334.
- Boudreau, B. P. & Westrich, J. T. (1984). The dependence of bacterial sulfate reduction on sulfate concentration in marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 48(12), 2503–2516.

- Bowman, R.A. (1988). A rapid method to determine total phosphorus in soils. *Soil Science Society of America Journal*, 52(5), 1301–1304.
- Broberg, O. & Persson, G. (1988). Particulate and dissolved phosphorus forms in freshwater: Composition and analysis. I G. Persson & M. Jansson (Red.), *Phosphorus in Freshwater Ecosystems*, 48 (s. 61–90). Netherlands: Springer.
- Brock, T. C. M., Boon, J. J. & Paffen, B. G. P. (1985). The effects of the season and of water chemistry on the decomposition of *Nymphaea alba* L.; Weight loss and pyrolysis mass spectrometry of the particulate matter. *Aquatic Botany*, 22(3–4), 197–229.
- Böttcher, M. E. & Lepland, A. (2000). Biogeochemistry of sulfur in a sediment core from the west-central Baltic Sea: Evidence from stable isotopes and pyrite textures. *Journal of Marine Systems*, 25(3–4), 299–312.
- Canfield, D. E., Raiswell, R. & Bottrell, S. (1992). The reactivity of sedimentary iron minerals toward sulfide. *American Journal of Science*, 292, 659–659.
- Canfield, D. E. & Thamdrup, B. (2005). *Aquatic geomicrobiology*. Gulf Professional Publishing. 640 s.
- Canfield, D. E. (1989). Reactive iron in marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 53(3), 619–632.
- Caraco, N. F., Cole, J. J. & Likens, G. E. (1993). Sulfate control of phosphorus availability in lakes. *Hydrobiologia*, 253(1–3), 275–280.
- Caraco, N. F., Cole, J. J. & Likens, G. E. (1989). Evidence for sulphate-controlled phosphorus release from sediments of aquatic systems. *Nature*, 341(6240), 316–318.
- Caraco, N., Cole, J. J. & Likens, G. E. (1990). A comparison of phosphorus immobilization in sediments of freshwater and coastal marine systems. *Biogeochemistry*, 9(3), 277–290.

- Caraco, N., Cole, J. J. & Likens, G. E. (1991). A cross-system study of phosphorus release from lake sediments. I J. Cole, G. Lovett & S. Findlay (Red.), *Comparative Analyses of Ecosystems* (s. 241–258). New York: Springer.
- Chapelle, Francis H., Bradley, Paul M., Thomas, Mary Ann, & McMahon, Peter B. (2009). Distinguishing iron-reducing from sulfate-reducing conditions. *Ground Water*, 47(2), 300–305.
- Childers, S. E., Ciufo, S. & Lovley, D. R. (2002). *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis. *Nature*, 416(6882), 767–769.
- Coelho, J. P., Flindt, M. R., Jensen, H. S., Lillebø, A. I. & Pardal, M. A. (2004). Phosphorus speciation and availability in intertidal sediments of a temperate estuary: relation to eutrophication and annual P-fluxes. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 61(4), 583–590.
- Compton, J., Mallinson, D., Glenn, C. R., Filippelli, G., Follmi, K., Shields, G. & Zanin, Y. (2000). Variations in the global phosphorus cycle. *SEPM Special Publication*, 66, 21–34.
- Dalton, J. D., Russell, G. C. & Sieling, D. H. (1952). Effect of organic matter on phosphate availability. *Soil Science*, 73(3), 173–182.
- De Jonge, V. N. & Villerius, L. A. (1989). Possible role of carbonate dissolution in estuarine phosphate dynamics. *Limnology and Oceanography*, 34(2), 332–340.
- Delaney, M. L. (1998). Phosphorus accumulation in marine sediments and the oceanic phosphorus cycle. *Global Biogeochemical Cycles*, 12(4), 563–572.
- Einsele, W. (1936). Über die Beziehungen des Eisenkreislaufs zum Phosphatkreislauf im eutrophen See. *Archiv für Hydrobiologie*, 29(6), 664–686.
- Ekholm, P. & Lehtoranta, J. (2012). Does control of soil erosion inhibit aquatic eutrophication? *Journal of Environmental Management*, 93(1), 140–146.

- Ekholm, P. (1994). Bioavailability of phosphorus in agriculturally loaded rivers in southern Finland. *Hydrobiologia*, 287(2), 179–194.
- Ekholm, P. (1998). *Algal-available phosphorus originating from agriculture and municipalities*. Helsinki: Finnish Environment Institute. 60 s.
- Ekholm, P. & Kallio, K. (1996). Observed nutrient fluxes from an agricultural catchment: normal vs mild winters. The Finnish research programme on climate change. *Publications of the Academy of Finland*, 4(96), 136–140.
- Ekholm, P. & Krogerus, K. (2003). Determining algal-available phosphorus of differing origin: routine phosphorus analyses versus algal assays. *Hydrobiologia*, 492(1–3), 29–42.
- Fanning, D. S., Rabenhorst, M. C. & Bigham, J. M. (1993). Colors of acid sulfate soils. *Soil color*, 31, 91–108.
- Fassel, V. A. & Kniseley, R. N. (1974). Inductively coupled plasma. Optical emission spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 46(13), 1110A–1120a.
- Froelich, P. N. (1988). Kinetic control of dissolved phosphate in natural rivers and estuaries: A primer on the phosphate buffer mechanism. *Limnology and oceanography*, 33(4), 649–668.
- Froelich, P. N., Bender, M. L., Luedtke, N. A., Heath, G. R. & De Vries, T. (1982). The marine phosphorus cycle. *American Journal of Science*, 282(4), 474–511.
- Gorby, Y. A., Yanina, S., McLean, J. S., Rosso, K. M., Moyle, D., Dohnalkova, A. & Fredrickson, J. K. (2006). Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), 11358–11363.
- Gorlenko, V., Tsapin, A., Namsaraev, Z., Teal, T., Tourova, T., Engler, D., Mielke, R. & Nealson, K. (2004). *Anaerobranca californiensis* sp. nov., an anaerobic, alkalithermophilic, fermentative bacterium isolated from a hot spring on Mono Lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(3), 739–743.

- Gunnars, A. & Blomqvist, S. (1997). Phosphate exchange across the sediment-water interface when shifting from anoxic to oxic conditions an experimental comparison of freshwater and brackish-marine systems. *Biogeochemistry*, 37(3), 203–226.
- Gunnars, A., Blomqvist, S., Johansson, P. & Andersson, C. (2002). Formation of Fe(III) oxyhydroxide colloids in freshwater and brackish seawater, with incorporation of phosphate and calcium. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66(5), 745–758.
- Gächter, R. & Müller, B. (2003). Why the phosphorus retention of lakes does not necessarily depend on the oxygen supply to their sediment surface. *Limnology and Oceanography*, 48(2), 929–933.
- Hacherl, E. L., Kosson, D. S. & Cowan, R. M. (2003). A kinetic model for bacterial Fe (III) oxide reduction in batch cultures. *Water resources research*, 39(4), 1098.
- Hartikainen, H. (1979). Phosphorus and its reactions in terrestrial soils and lake sediments. *Journal of the Scientific Agricultural Society of Finland*, 51, 537–624.
- Hartikainen, H. (1991). Potential mobility of accumulated phosphorus in soil as estimated by the indices of Q/I plots and by extractant. *Soil Science*, 152(3), 204–209.
- Hartikainen, H. & Yli-Halla, M. (1996). Solubility of soil phosphorus as influenced by urea. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 159(4), 327–332.
- Hasler, A. D. & Einsele, W. G. (1948). Fertilization for increasing productivity of natural inland waters. Artikel presenterad vid Transactions of the 13th North American Wildlife Conference.
- Hawke, D., Carpenter, P. D. & Hunter, K. A. (1989). Competitive adsorption of phosphate on goethite in marine electrolytes. *Environmental Science & Technology*, 23(2), 187–191.
- Hingston, F. J., Atkinson, R. J., Posner, A. M. & Quirk, J. P. (1967). Specific adsorption of anions. *Nature*, 215, 1459–1461.



- Hyacinthe, C. & Van Cappellen, P. (2004). An authigenic iron phosphate phase in estuarine sediments: composition, formation and chemical reactivity. *Marine Chemistry*, 91(1–4), 227–251.
- Iho, A. & Laukkanen, M. 2012. Gypsum amendment as a means to reduce agricultural phosphorus loading: an economic appraisal. *Agricultural and Food Science* 21(3), 307–324.
- Ingvorsen, K., Zehnder, A. J. B. & Jørgensen, B. B. (1984). Kinetics of sulfate and acetate uptake by *Desulfobacter postgatei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(2), 403–408.
- Jakobsen, R., Albrechtsen, H-J., Rasmussen, M., Bay, H., Bjerg, P. L. & Christensen, T. H. (1998). H<sub>2</sub>-concentrations in a landfill leachate plume (Grindsted, Denmark): *In situ* energetics of terminal electron acceptor processes. *Environmental Science & Technology*, 32(14), 2142–2148.
- Jeppesen, E., Søndergaard, M., Jensen, J. P., Mortensen, E., Hansen, A-M. & Jørgensen, T. (1998). Cascading trophic interactions from fish to bacteria and nutrients after reduced sewage loading: An 18-year study of a shallow hypertrophic lake. *Ecosystems*, 1(3), 250–267.
- Jonsson, A. (1997). Fe and Al sedimentation and their importance as carriers for P, N and C in a large humic lake in northern Sweden. *Water, Air and Soil Pollution*, 99, 283–295.
- Jordan, T. E., Cornwell, J. C., Boynton, W. R. & Anderson, J. T. (2008). Changes in phosphorus biogeochemistry along an estuarine salinity gradient: The iron conveyor belt. *Limnology and Oceanography*, 53(1), 172–184.
- Jørgensen, B. B. (1982). Mineralization of organic matter in the sea bed – the role of sulphate reduction. *Nature* 296, 643–645.
- Jørgensen, B. B. (2011). Deep seafloor microbial cells on physiological standby. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(45), 18193–18194.

- Kappler, A., Benz, M., Schink, B. & Brune, A. (2004). Electron shuttling via humic acids in microbial iron(III) reduction in a freshwater sediment. *FEMS Microbiology Ecology*, 47(1), 85–92.
- Katsev, S., Tsandev, I., L'Heureux, I. & Rancourt, D. G. (2006). Factors controlling long-term phosphorus efflux from lake sediments: Exploratory reactive-transport modeling. *Chemical Geology*, 234(1–2), 127–147.
- Kondo, R., Purdy, K. J., de Queiroz Silva, S. & Nedwell, D. B. (2007). Spatial dynamics of sulphate-reducing bacterial compositions in sediment along a salinity gradient in a UK estuary. *Microbes and Environments*, 22(1), 11–19.
- Köppä, P. (1985). *Kasvinviljelyoppi 3. Kasvinsuojelu*. (3. upplagan). Helsingfors: Kirjayhtymä. 196 s.
- Lamers, L. P. M., Tomassen, H. B. M., & Roelofs, J. G. M. (1998). Sulfate-Induced Eutrophication and Phytotoxicity in Freshwater Wetlands. *Environmental Science & Technology*, 32(2), 199–205.
- Laukkanen M. & Nauges C. (2012). Evaluating greening farm policies: A structural model for assessing agri-environmental subsidies, *Government Institute for Economic Research Working Papers* 40, 40 s.
- Lehtoranta, J. & Heiskanen, A-S. (2003). Dissolved iron:phosphate ratio as an indicator of phosphate release to oxic water of the inner and outer coastal Baltic Sea. *Hydrobiologia*, 492(1–3), 69–84.
- Lehtoranta, J., Heiskanen, A-S. & Pitkänen, H. (2004). Particulate N and P characterizing the fate of nutrients along the estuarine gradient of the River Neva (Baltic Sea). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 61(2), 275–287.
- Li, R., Tiedje, J. M., Chiu, C. & Worden, R. M. (2012). Soluble electron shuttles can mediate energy taxis toward insoluble electron acceptors. *Environmental Science & Technology*, 46(5), 2813–2820.

- Lovley, D. R., Giovannoni, S. J., White, D. C., Champine, J. E., Phillips, E. J. P., Gorby, Y. A. & Goodwin, S. (1993). *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Archives of Microbiology*, 159(4), 336–344.
- Lovley, D. R. (1991). Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction. *Microbiological Reviews*, 55(2), 259.
- Lovley, D. R. (2000). Fe (III) and Mn (IV) reduction. I *Environmental Microbe-Metal Interactions* (s. 3–30). Washington DC: ASM Press.
- Lovley, D. R., Coates, J. D., Blunt-Harris, E. L., Phillips, E. J. P. & Woodward, J. C. (1996). Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature*, 382(6590), 445–448.
- Lovley, D. R. & Phillips, E. J. P. (1987). Competitive mechanisms for inhibition of sulfate reduction and methane production in the zone of ferric iron reduction in sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(11), 2636–2641.
- Lovley, D. R. & Phillips, E. J. P. (1988). Novel mode of microbial energy metabolism: Organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(6), 1472–1480.
- Lukkari, K., Leivuori, M. & Hartikainen, H. (2008). Vertical distribution and chemical character of sediment phosphorus in two shallow estuaries in the Baltic Sea. *Biogeochemistry*, 90(2), 171–191.
- Lukkari, K., Leivuori, M., Vallius, H., & Kotilainen, A. (2009). The chemical character and burial of phosphorus in shallow coastal sediments in the northeastern Baltic Sea. *Biogeochemistry*, 94(2), 141–162.
- Machel, H. G. (1998). Gas souring by thermochemical sulfate reduction at 140 °C: discussion. *AAPG Bulletin*, 82(10), 1870–1873.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V. & Clark, D. P. (2009). *Brock Biology of Microorganisms* (12. upplagan). Pearson Benjamin Cummings. 1061 s.

- Manahan, S. E. (2005). *Environmental chemistry*. CRC press. 783 s.
- McCuen, R., Knight, Z. & Cutter, A. (2006). Evaluation of the Nash–Sutcliffe Efficiency Index. *Journal of Hydrologic Engineering*, 11(6), 597–602.
- McKeague, J. A. & Day, J. H. (1966). Dithionite- and oxalate-extractable Fe and Al as aids in differentiating various classes of soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 46(1), 13–22.
- McLaughlin, J. R., Ryden, J. C. & Syers, J. K. (1981). Sorption of inorganic phosphate by iron- and aluminium-containing components. *Journal of Soil Science*, 32(3), 365–378.
- Mortimer, C. H. (1971). Chemical exchanges between sediments and water in the Great Lakes-speculations on probable regulatory mechanisms. *Limnology and Oceanography*, 16(2), 387–404.
- Nash, J. & Sutcliffe, J. V. (1970). River flow forecasting through conceptual models part I – a discussion of principles. *Journal of Hydrology*, 10(3), 282–290.
- Nevin, K. P. & Lovley, D. R. (2000). Lack of production of electron-shuttling compounds or solubilization of Fe(III) during reduction of insoluble Fe(III) oxide by *Geobacter metallireducens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2248–2251.
- Nevin, K. P. & Lovley, D. R. (2002). Mechanisms for accessing insoluble Fe(III) oxide during dissimilatory Fe(III) reduction by *Geothrix fermentans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2294–2299.
- Newman, S. & Reddy, K. R. (1992). Sediment resuspension effects on alkaline phosphatase activity. *Hydrobiologia*, 245(2), 75–86.
- Nriagu, J. O. & Hem, J. D. (1978). Chemistry of pollutant sulfur in natural waters. *Sulfur in the Environment* (s. 448–450). New York: John Wiley and Sons.

- Pallud, C. & Van Cappellen, P. (2006). Kinetics of microbial sulfate reduction in estuarine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(5), 1148–1162.
- Parkes, R. J., Cragg, B. A. & Wellsbury, P. (2000). Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: A review. *Hydrogeology Journal*, 8(1), 11–28.
- Patrick, W. H. & Khalid, R. A. (1974). Phosphate release and sorption by soils and sediments: Effect of aerobic and anaerobic conditions. *Science*, 186(4158), 53–55.
- Peiffer, S., Dos Santos Afonso, M., Wehrli, B. & Gaechter, R. (1992). Kinetics and mechanism of the reaction of hydrogen sulfide with lepidocrocite. *Environmental Science & Technology*, 26(12), 2408–2413.
- Persson, G. (1990). Utilization of phosphorus in suspended particulate matter as tested by algal bioassays. *Internationale Vereinigung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie*, 24(1), 242–246.
- Pitkänen, H., Lehtoranta, J. & Räike, A. (2001). Internal nutrient fluxes counteract decreases in external load: The case of the estuarial eastern Gulf of Finland, Baltic Sea. *Ambio: A Journal of the Human Environment*, 30(4), 195–201.
- Pollock, J., Weber, K. A., Lack, J., Achenbach, L. A., Mormile, M. R. & Coates, J. D. (2007). Alkaline iron(III) reduction by a novel alkaliphilic, halotolerant, *Bacillus* sp. isolated from salt flat sediments of Soap Lake. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(4), 927–934.
- Postma, D. & Jakobsen, R. (1996). Redox zonation: Equilibrium constraints on the Fe(III)/SO<sub>4</sub>-reduction interface. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60(17), 3169–3175.
- Poulton, S. W., Krom, M. D., van Rijn, J., Raiswell, R. & Bows, R. (2003). Detection and removal of dissolved hydrogen sulphide in flow-through systems via the sulphidation of hydrous iron (III) oxides. *Environmental Technology*, 24(2), 217–229.

- Poulton, S. W., Krom, M. D. & Raiswell, R. (2004). A revised scheme for the reactivity of iron (oxyhydr)oxide minerals towards dissolved sulfide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68(18), 3703–3715.
- Ravenschlag, K., Sahm, K., Knoblauch, C., Jørgensen, B. B. & Amann, R. (2000). Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine arctic sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3592–3602.
- Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T. & Lovley, D. R. (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, 435(7045), 1098–1101.
- Reis, M. A. M., Almeida, J. S., Lemos, P. C., & Carrondo, M. J. T. (1992). Effect of hydrogen sulfide on growth of sulfate reducing bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 40(5), 593–600.
- Rekolainen, S., Ekholm, P., Ulén, B., Gustafson, A., Tunney, H., Carton, O. T., Brookes, P. C. & Johnston, A. E. (1997). Phosphorus losses from agriculture to surface waters in the Nordic Countries. Artikel presenterad vid Phosphorus Loss from Soil to Water. Proceedings of a workshop, Wexford, Irish Republic, 29–31 september 1995.
- Rekolainen, S. (1993). *Assessment and mitigation of agricultural water pollution: National Board of Waters and the Environment*. Vesi-ja ympäristöhallitus. 34 s.
- Rickard, David, & Luther III, G. W. (1997). Kinetics of pyrite formation by the H<sub>2</sub>S oxidation of iron(II) monosulfide in aqueous solutions between 25 and 125°C: The mechanism. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61(1), 135–147.
- Roden, E. E. & Edmonds, J. W. (1997). Phosphate mobilization in iron-rich anaerobic sediments: microbial Fe (III) oxide reduction versus iron-sulfide formation. *Archiv für Hydrobiologie*, 139(3), 347–378.
- Roden, E. E. (2003). Fe(III) oxide reactivity toward biological versus chemical reduction. *Environmental Science & Technology*, 37(7), 1319–1324.

- Roden, E. E. (2008). Microbiological controls on geochemical kinetics 1: Fundamentals and case study on microbial Fe(III) oxide reduction. I S. L. Brantley, J. D. Kubicki & A. F. White (Red.), *Kinetics of Water-Rock Interaction* (s. 335–415). New York: Springer.
- Roden, E. E. & Zachara, J. M. (1996). Microbial reduction of crystalline iron(III) oxides: Influence of oxide surface area and potential for cell growth. *Environmental Science & Technology*, 30(5), 1618–1628.
- Roden, E. E. & Tuttle, J. H. (1993). Inorganic sulfur turnover in oligohaline estuarine sediments. *Biogeochemistry*, 22(2), 81–105.
- Rozan, T. F., Taillefert, M., Trouwborst, R. E., Glazer, B. T., Ma, S., Herszage, J., Valdes, L. M., Price, K. S. & Luther III, G. W. (2002). Iron-sulfur-phosphorus cycling in the sediments of a shallow coastal bay: Implications for sediment nutrient release and benthic macroalgal blooms. *Limnology and Oceanography*, 47(5), 1346–1354.
- Ruttenberg, Kathleen C. (1992). Development of a sequential extraction method for different forms of phosphorus in marine sediments. *Limnology and Oceanography*, 37(7), 1460–1482.
- Saarela, I. (1991). Optimum phosphorus fertilization in respect to soil fertility and environment. Artikel presenterad vid FAO/ECE-Symposium on methods and concepts for the use of organic and chemical fertilizers, Genève, Schweiz, 14–18 januari 1991.
- Sahm, K., MacGregor, B. J., Jørgensen, B. B. & Stahl, D. A. (1999). Sulphate reduction and vertical distribution of sulphate-reducing bacteria quantified by rRNA slot-blot hybridization in a coastal marine sediment. *Environmental Microbiology*, 1(1), 65–74.
- Schink, B. (1990). Conservation of small amounts of energy in fermenting bacteria. *Biotechnology, focus*, 2, 63–89.

Schwertmann, U. (1966). Inhibitory effect of soil organic matter on the crystallization of amorphous ferric hydroxide. *Nature*, 212(5062), 645–646.

Schwertmann, U. & Cornell, R. M. (2008). *Iron oxides in the laboratory*. John Wiley & Sons. 188 s.

Sharpley, A. N., Ahuja, L. R., Yamamoto, M. & Menzel, R. G. (1981). The kinetics of phosphorus desorption from soil. *Soil Science of Society America Journal*, 45(3), 493–496.

Sippola, J. (1974). *Mineral composition and its relation to texture and to some chemical properties in Finnish subsoils* (avhandling). Annales agriculture fenniae 13. 173–234.

Slomp, C. P., Malschaert, J. F. P. & Van Raaphorst, W. (1998). The role of adsorption in sediment-water exchange of phosphate in North Sea continental margin sediments. *Limnology and Oceanography*, 43(5), 832–846.

Smith, R. L. & Klug, M. J. (1981). Reduction of sulfur compounds in the sediments of a eutrophic lake basin. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(5), 1230–1237.

Soetaert, K., Hofmann, A. F., Middelburg, J. J., Meysman, F. J. R. & Greenwood, J. (2007). The effect of biogeochemical processes on pH. *Marine Chemistry*, 105(1–2), 30–51.

Struthers, P. H. & Sieling, D. H. (1950). Effect of organic anions on phosphate precipitation by iron and aluminum as influenced by pH. *Soil Science*, 69(3), 205–214.

Sugawara, K., Koyama, T. & Kamata, E. (1957). Recovery of precipitated phosphate from lake muds related to sulfate reduction. *The Journal of Earth Sciences*, 5(1), 60–67.

Sundby, B., Gobeil, C., Silverberg, N. & Mucci, A. (1992). The phosphorus cycle in coastal marine sediments. *Limnology and Oceanography*, 37(6), 1129–1145.



Switzer Blum, J., Burns Bindi, A., Buzzelli, J., Stolz, J. F. & Oremland, R. S. (1998). *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic. *Archives of Microbiology*, 171(1), 19–30.

Thamdrup, B. (2000). Bacterial manganese and iron reduction in aquatic sediments I Schink, B. (Red.), *Advances in microbial ecology*, 16 (s. 41–84). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Thamdrup, B. & Canfield, D. E. (2000). Benthic respiration in aquatic sediments. I Sala, O. E., Jackson, R. B., Mooney, H. A. & Howarth, R. W (Red.), *Methods in Ecosystem Science* (s. 86–103). New York: Springer.

Thamdrup, B., Finster, K., Hansen, J. W. & Bak, F. (1993). Bacterial disproportionation of elemental sulfur coupled to chemical reduction of iron or manganese. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(1), 101–108.

Thomsen, U., Thamdrup, B., Stahl, D. A. & Canfield, D. E. (2004). Pathways of organic carbon oxidation in a deep lacustrine sediment, Lake Michigan. *Limnology and Oceanography*, 49(6), 2046–2057.

Turick, C. E., Tisa, L. S. & Caccavo, F. Jr. (2002). Melanin production and use as a soluble electron shuttle for Fe(III) oxide reduction and as a terminal electron acceptor by *Shewanella algae* BrY. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2436–2444.

Turtola, E. & Paajanen, A. (1995). Influence of improved subsurface drainage on phosphorus losses and nitrogen leaching from a heavy clay soil. *Agricultural Water Management*, 28(4), 295–310.

Uusitalo, R. (2004). *Potential bioavailability of particulate phosphorus in runoff from arable clayey soils* (doktorsavhandling). Agrifood Research Reports, 53, 99 s.

Uusitalo, R. & Ekholm, P. (2003). Phosphorus in runoff assessed by anion exchange resin extraction and an algal assay. *Journal of Environmental Quality*, 32(2), 633–641.

Uusitalo, R., Ekholm, P., Turtola, E., Pitkänen, H., Lehtonen, H., Granlund, K., Bäck, S., Puustinen, M., Räike, A., Lehtoranta, J. (2007). Maatalous Itämeren rehevöittäjänä. *Maa- ja elintarviketalous*, 96. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus. 34 s.

Uusitalo, R. & Turtola, E. (2003). Determination of redox-sensitive phosphorus in field runoff without sediment preconcentration. *Journal of Environmental Quality*, 32(1), 70–77.

Uusitalo, R., Turtola, E., Puustinen, M., Paasonen-Kivekäs, M. & Uusi-Kämpä, J. (2003). Contribution of particulate phosphorus to runoff phosphorus bioavailability. *Journal of Environmental Quality*, 32(6), 2007–2016.

Walker, J. C. G. (1987). Was the Archaean biosphere upside down? *Nature*, 329(6141), 710–712.

Vargas, M., Kashefi, K., Blunt-Harris, E. L. & Lovley, D. R. (1998). Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early Earth. *Nature*, 395(6697), 65–67.

Weber, K. A., Achenbach, L. A. & Coates, J. D. (2006). Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology*, 4(10), 752–764.

Weston, N. B., Dixon, R. E. & Joye, S. B. (2006). Ramifications of increased salinity in tidal freshwater sediments: Geochemistry and microbial pathways of organic matter mineralization. *Journal of Geophysical Research*, 111, G01009.

Westrich, J. T. (1983). *Consequences and controls of bacterial sulfate reduction in marine sediments* (doktorsavhandling). Yale University, 530 s.

Williams, J. D. H., Shear, H. & Thomas, R. L. (1980). Availability to *Scenedesmus quadricauda* of different forms of phosphorus in sedimentary materials from the Great Lakes. *Limnology and Oceanography*, 25(1), 1–11.

Vuorenmaa, J., Rekolainen, S., Lepistö, A., Kenttämies, K. & Kauppila, P. (2002). Losses of nitrogen and phosphorus from agricultural and forest areas in Finland

during the 1980s and 1990s. *Environmental Monitoring and Assessment*, 76(2), 213–248.

Yao, W. & Millero F. H. (1995). Oxidation of hydrogen sulfide by Mn(IV) and Fe(III) (hydr)oxides in seawater. I *Geochemical Transformations of Sedimentary Sulfur*, 612 (s. 260–279). American Chemical Society.

Yao, W. & Millero, F. J. (1996). Oxidation of hydrogen sulfide by hydrous Fe(III) oxides in seawater. *Marine Chemistry*, 52(1), 1–16.

Ye, Q., Roh, Y., Carroll, S. L., Blair, B., Zhou, J., Zhang, C. L. & Fields, M. W. (2004). Alkaline anaerobic respiration: Isolation and characterization of a novel alkaliphilic and metal-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5595–5602.

Yli-Halla, M. (1990). Comparison of a bioassay and three chemical methods for determination of plant-available P in cultivated soils of Finland. *Journal of Agricultural Science in Finland*, 62(3), 213–219.

Yli-Halla, M., Hartikainen, H., Ekholm, P., Turtola, E., Puustinen, M. & Kallio, K. (1995). Assessment of soluble phosphorus load in surface runoff by soil analyses. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 56(1), 53–62.

Yli-Halla, M., Tattari, S., Bärlund, I., Tuhkanen, H-R., Posch, M., Siimes, K. & Rekolainen, S. (2005). Simulating processes of soil phosphorus in geologically young acidic soils of Finland. *Transactions of the ASAE*, 48(1), 101–108.

**Webadresser till använda bilder:**

<http://www.coloringplanet.com>.

<http://www.nzdl.org/gsdlmod?e=d-00000-00---off-0fnl2.2--00-0----0-10-0---0---0direct-10---4-----0-11--11-en-50---20-about---00-0-1-00-0--4----0-0-11-10-0utfZz-8-00&cl=CL3.50&d=HASH017ca462cbab47b5c8e2f75a.4.9&gt=1>

<http://www.wonderama.org/scienceparty2.htm>

<http://www.health.state.mn.us/divs/idepc/dtopics/stds/mnpharmacy.html>

## BILAGA 1

Tabell I Håkansböle, dag 141.

Nummer	Jord g	C mg	Fe <sup>2+</sup> mg/l	Fe <sup>2+</sup> mg/g	TDP mg/l	TDP mg/g	Färg	Lukt
1	0,06	0,75	0,02	0,02	0,18	0,22	brun	ja
2c	0,09	0,375	0,00	0,00	0,17	0,16	brun	
2	0,09	0,375	0,00	0,00	0,16	0,14	brun	nej
3	0,09	3	0,10	0,09	0,30	0,26	brun	ja
3c	0,09	3	0,02	0,02	0,44	0,40	mörkgrå	
4	0,13	1,5	0,05	0,03	0,71	0,45	mörkgrå	ja
5	0,25	0,75	0,20	0,06	0,42	0,13	ljusbrun	ja
6	0,25	1,5	0,18	0,06	1,07	0,34	grå	ja
7,1	0,25	3	0,03	0,01	1,39	0,43	mörkgrå	ja
7,2	0,25	3	0,03	0,01	1,31	0,41	mörkgrå	ja
7,3	0,25	3	0,02	0,01	1,20	0,37	mörkgrå	ja
7,4	0,25	3	0,02	0,01	1,26	0,39	mörkgrå	ja
7,5	0,25	3	0,02	0,01	1,16	0,37	mörkgrå	ja
8	0,25	6	0,03	0,01	1,36	0,44	mörkgrå	ja
9	0,25	12	0,02	0,01	1,36	0,44	mörkgrå	ja
10	0,50	6	0,01	0,00	2,27	0,36	mörkgrå	ja
11	0,71	3	0,76	0,08	2,82	0,31	mörkgrå	ja
11c	0,71	3	0,86	0,10	2,24	0,25	mörkgrå	
12	0,71	24	0,02	0,00	3,03	0,34	svart	ja
12c	0,71	24	0,02	0,00	3,14	0,36	mörkgrå	ja
13	1,01	12	0,04	0,00	2,80	0,22	svart	ja
1d	0,06	0	0,00	0,00	0,22	0,27	prickar	
1e	0,06	0	0,00	0,00	0,17	0,21	prickar	
13d	1,00	0	0,02	0,00	0,31	0,02	gråbrun	
13e	1,00	0	0,13	0,01	0,16	0,01	gråbrun	

Tabell II Håkansböle, dag 196

Nummer	Jord g	C · x mg	Fe <sup>2+</sup> mg/l	Fe <sup>2+</sup> mg/g	P mg/l	P mg/g	Färg	Lukt
1	0,06	0,75	0,20	0,24	0,23	0,27	Brun	Ja
2c	0,09	0,375	0,32	0,27	0,20	0,17	Brun	Lite
2	0,09	0,375	0,04	0,03	0,15	0,12	Brun	Ja
3	0,09	3	0,18	0,14	0,33	0,27	Brun	Ja
3c	0,09	3	0,05	0,04	0,48	0,40	Mörkgrå	Ja
4	0,13	1,5	0,05	0,03	0,69	0,41	Mörkgrå	Ja
5	0,25	0,75	0,59	0,18	0,96	0,29	Grå	Ja
6	0,25	1,5	0,05	0,01	1,23	0,37	Svart	Ja
7,1	0,25	3	0,06	0,02	1,42	0,41	Mörkgrå	Ja
7,2	0,25	3	0,05	0,01	1,32	0,39	Mörkgrå	Ja
7,3	0,25	3	0,05	0,01	1,30	0,38	Mörkgrå	Ja
7,4	0,25	3	0,05	0,01	1,34	0,39	Mörkgrå	Ja
7,5	0,25	3	0,05	0,01	1,26	0,37	Mörkgrå	Ja
8	0,25	6	0,05	0,01	1,34	0,40	Grå	Ja
9	0,25	12	0,04	0,01	1,26	0,38	Svart	Ja
10	0,50	6	0,04	0,01	2,40	0,35	Mörkgrå	Ja
11	0,71	3	0,05	0,01	2,98	0,31	Svart	Ja
11c	0,71	3	0,04	0,00	3,02	0,32	Svart	Ja
12	0,71	24	0,05	0,00	3,17	0,33	Svart	Ja
12c	0,71	24	0,04	0,00	3,19	0,34	Svart	Ja
13	1,01	12	0,05	0,00	4,05	0,29	Svart	Ja
1d	0,06	0	0,03	0,03	0,12	0,14	Brun	Nej
1e	0,06	0	0,02	0,03	0,12	0,14	Brun	Nej
13d	1,00	0	0,33	0,02	0,31	0,02	Mörkbrun	Nej
13e	1,00	0	0,57	0,04	0,43	0,03	Mörkbrun	Nej

Tabell III Håkansböle dag 308 del 1

Nummer	Jord	$C \cdot y$	$Fe^{2+}$	$Fe^{2+}$	TFe	TP	TP
	g	mg	mg/l	mg/g	mg/l	mg/l	mg/g
1	0,06	0,75	0,27	0,29	1,80	0,39	0,42
2c	0,09	0,375	0,07	0,06	3,20	0,53	0,42
2	0,09	0,375	0,01	0,00	2,40	0,54	0,41
3	0,09	3	-0,02	0,00	1,00	0,60	0,46
3c	0,09	3	0,01	0,00	2,40	0,57	0,44
4	0,13	1,5	0,01	0,01	2,00	0,88	0,48
5	0,25	0,75	0,06	0,02	1,80	1,31	0,36
6	0,25	1,5	0,01	0,00	0,89	1,37	0,38
7,1	0,25	3	0,00	0,00	0,96	1,59	0,42
7,2	0,25	3	-0,01	0,00	0,66	1,45	0,39
7,3	0,25	3	-0,01	0,00	1,80	1,51	0,41
7,4	0,25	3	0,00	0,00	0,63	1,48	0,40
7,5	0,25	3	-0,01	0,00	0,87	1,41	0,39
8	0,25	6	0,01	0,00	5,60	1,67	0,46
9	0,25	12	0,05	0,01	0,93	1,45	0,40
10	0,50	6	0,00	0,00	3,60	2,73	0,38
11	0,71	3	0,00	0,00	2,30	3,50	0,34
11c	0,71	3	0,00	0,00	1,90	3,38	0,33
12	0,71	24	0,01	0,00	1,80	3,60	0,35
12c	0,71	24	-0,01	0,00	1,30	3,59	0,35
13	1,01	12	0,01	0,00	8,30	4,58	0,31
1d	0,06	0	-0,02	0,00	4,50	0,20	0,22
1e	0,06	0	-0,02	0,00	0,79	0,17	0,19
13d	1,00	0	0,71	0,05	6,20	0,75	0,05
13e	1,00	0	1,03	0,07	4,40	0,83	0,06

Tabell IV Håkansböle dag 308 del 2

Nummer	Jord g	C · y mg	NH <sub>4</sub> -N mg/l	SO <sub>4</sub> mg/l	DOC mg/l	pH	Färg	Lukt
1	0,06	0,75	0,12	697	12	7,8	Mörkgrå	Ja
2c	0,09	0,375	0,18	782	11	10,1	Mörkgrå	Ja
2	0,09	0,375	0,13	816	12	10,1	Mörkgrå	Ja
3	0,09	3	0,13	709	16	7,9	Svart	Stark
3c	0,09	3	0,11	661	15	9,7	Svart	Stark
4	0,13	1,5	0,11	652	14	10,1	Svart	Ja
5	0,25	0,75	0,16	706	13	10,1	Svart	Ja
6	0,25	1,5	0,15	652	14	10,1	Svart	Ja
7,1	0,25	3	0,17	703	13	10,1	Mörkgrå	Ja
7,2	0,25	3	0,13	717	16	7,9	Mörkgrå	Stark
7,3	0,25	3	0,11	693	16	7,9	Mörkgrå	Stark
7,4	0,25	3	0,10	776	16	7,8	Mörkgrå	Stark
7,5	0,25	3	0,10	645	16	7,8	Mörkgrå	Stark
8	0,25	6	0,06	521	22	9,3	Mörkgrå	Ja
9	0,25	12	0,08	577	36	8,1	Mörkgrå	Stark
10	0,50	6	0,11	613	21	9,4	Mörkgrå	Ja
11	0,71	3	0,16	493	18	9,6	Svart	Ja
11c	0,71	3	0,15	484	18	10,2	Svart	Ja
12	0,71	24	0,14	361	63	9,1	Svart	Stark
12c	0,71	24	0,17	436	62	8,0	Svart	Stark
13	1,01	12	0,13	213	37	9,5	Svart	Ja
1d	0,06	0	0,17	623	10	10,3	Brun	Nej
1e	0,06	0	0,12	833	11	10,2	Brun	Nej
13d	1,00	0	0,16	833	11	10,0	Brun	Nej
13e	1,00	0	0,21	826	11	9,5	Olivgrön	Nej



## BILAGA 1

Tabell V Vik, dag 738, ICP-EOS-resultaten

Nr	Jord	C	Al	Ca	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	S	Si
	g	mg	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
1	0,06	0,75	0,02	68,9	0,37	51,1	166	0,00	1320	0,35	109	2,10
2	0,09	0,375	0,01	70,0	0,61	51,0	167	0,00	1320	0,42	111	2,03
3	0,09	3	0,00	70,6	0,00	50,6	169	0,00	1360	0,57	96	2,30
4	0,13	1,5	0,01	71,9	0,00	51,2	169	0,00	1370	0,71	99	2,80
5	0,25	0,75	0,02	75,1	0,71	49,5	167	0,00	1360	0,88	108	2,87
6	0,25	1,5	0,00	74,5	0,03	50,0	167	0,00	1370	1,34	92	3,21
7	0,25	3	0,00	73,6	0,00	49,8	167	0,00	1380	1,37	86	3,21
8	0,25	3	0,00	73,9	0,00	49,7	167	0,00	1400	1,48	83	3,35
9	0,25	3	0,11	71,9	0,00	49,6	165	0,00	1370	1,52	83	3,58
10	0,25	3	0,00	73,2	0,00	49,8	165	0,00	1380	1,37	82	2,96
11	0,25	3	0,00	73,6	0,00	49,6	167	0,00	1380	1,43	81	3,23
12	0,25	6	0,00	71,0	0,00	49,8	165	0,00	1410	1,55	69	3,26
13	0,25	12	0,01	71,0	0,00	48,7	163	0,00	1430	1,54	66	3,23
14	0,50	6	0,07	73,3	0,00	45,7	158	0,00	1370	2,46	51	3,76
15	0,71	3	0,00	81,0	0,54	45,4	165	0,00	1370	2,48	76	4,81
16	0,71	24	0,04	73,4	0,00	42,0	151	0,00	1530	3,46	21	4,08
17	1,00	12	0,02	77,0	0,01	39,3	151	0,00	1440	4,34	2	4,45
18	0,09	0,375	0,00	71,9	0,42	54,0	170	0,00	1360	0,43	110	2,16
19	0,09	3	0,05	71,0	0,00	53,2	170	0,00	1390	0,62	95	2,41
20	0,71	3	0,00	83,2	0,50	46,0	167	0,00	1370	2,50	74	4,75
21	0,71	24	0,00	72,4	0,00	41,9	149	0,00	1510	3,58	21	4,12
22	0,09	0,375	0,00	72,4	0,68	53,9	171	0,00	1340	0,44	111	2,39
23	0,09	3	0,00	71,5	0,00	54,5	172	0,00	1370	0,63	95	2,41
24	0,71	3	0,00	82,2	0,74	46,6	167	0,00	1370	2,34	80	4,74
25	0,71	24	0,00	72,7	0,00	43,0	151	0,00	1500	3,44	23	4,14
26	0,06	0	0,00	70,6	0,37	54,4	172	0,00	1340	0,13	110	1,85
27	0,06	0	0,06	71,8	0,14	55,8	175	0,00	1360	0,12	111	2,21
28	1,00	0	0,00	89,8	2,53	45,8	171	0,16	1320	0,53	112	5,25
29	1,00	0	0,00	88,8	2,67	45,9	170	0,02	1330	0,71	112	4,81
Kontr1	0	0	0,02	70,7	0,00	56,3	174	0,00	1360	0,00	111	1,54
Kontr2	0	0	0,00	70,2	0,00	56,1	172	0,00	1340	0,00	110	1,65
Kontr3	0	0	0,00	70,4	0,00	56,3	173	0,00	1350	0,00	111	1,57

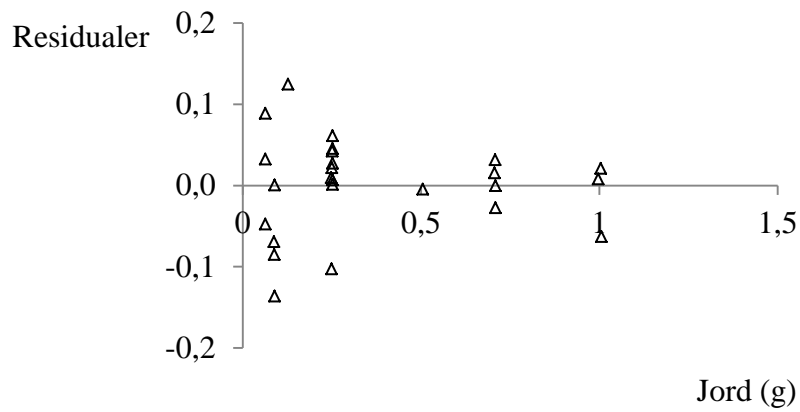
Tabell VI Vik, dag 861, ICP-OES-resultaten.

	Jord	C	Al	Ca	Fe	K	Mn	Na	P	S	Si
	g	mg	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
1	0,06	0,75	0,00	67,5	0,01	48,6	0,14	956	0,20	120	1,62
2	0,09	0,375	0,00	68,8	0,01	-	0,24	922	0,28	121	1,65
3	0,09	3	0,00	67,2	0,00	48,0	0,18	930	0,66	646	2,03
4	0,13	1,5	0,00	69,0	0,10	48,0	0,27	901	0,82	113	2,45
5	0,25	0,75	0,00	71,5	0,84	47,0	0,43	888	1,05	120	2,43
6	0,25	1,5	0,00	70,7	0,10	46,3	0,40	879	1,44	104	2,60
7	0,25	3	0,00	69,9	0,01	46,2	0,28	879	1,46	247	2,66
8	0,25	3	0,00	69,6	0,00	46,0	0,32	875	1,61	187	2,67
9	0,25	3	0,00	69,9	0,00	46,2	0,27	867	1,63	409	2,86
10	0,25	3	0,00	69,3	0,00	46,5	0,23	855	1,49	994	2,51
11	0,25	3	0,00	69,8	0,00	46,2	0,31	907	1,61	339	2,63
12	0,25	6	0,00	69,2	0,00	45,9	0,27	898	1,75	1320	2,55
13	0,25	12	0,00	67,8	0,00	45,7	0,32	909	1,79	2520	2,57
14	0,50	6	0,00	71,6	0,00	43,3	0,29	858	2,84	1560	2,88
15	0,71	3	0,00	76,8	0,53	41,5	0,88	835	2,89	68	3,59
16	0,71	24	0,00	69,1	0,00	40,1	0,37	893	3,92	1080	3,11
17	1,00	12	0,00	73,6	0,04	36,9	0,45	853	4,83	7	3,35
18	0,09	0,375	0,00	68,0	0,14	48,8	0,20	820	0,44	97	1,67
19	0,09	3	0,00	67,1	0,00	48,5	0,17	826	0,72	1030	1,99
20	0,71	3	0,00	76,2	0,41	42,5	0,83	811	2,85	67	3,55
21	0,71	24	0,00	70,6	0,00	38,1	0,39	1020	3,80	1150	3,13
22	0,09	0,375	0,00	68,7	0,48	46,5	0,25	886	0,53	117	1,98
23	0,09	3	0,00	68,3	0,00	46,8	0,23	885	0,72	872	1,99
24	0,71	3	0,00	78,5	0,83	39,9	1,08	872	2,51	82	3,64
25	0,71	24	0,00	71,1	0,00	38,2	0,48	934	3,48	1160	3,18
26	0,06	0	0,00	68,9	0,61	46,3	0,13	856	0,21	118	1,74
27	0,06	0	0,00	68,8	0,22	46,5	0,11	842	0,18	117	1,97
28	1,00	0	0,00	87,0	6,58	38,8	1,59	840	1,30	118	4,16
29	1,00	0	0,00	86,4	4,87	39,2	1,48	834	1,18	119	3,93
Kontroll	0	0	0,00	67,1	0,01	46,6	0,01	830	0,04	117	1,45

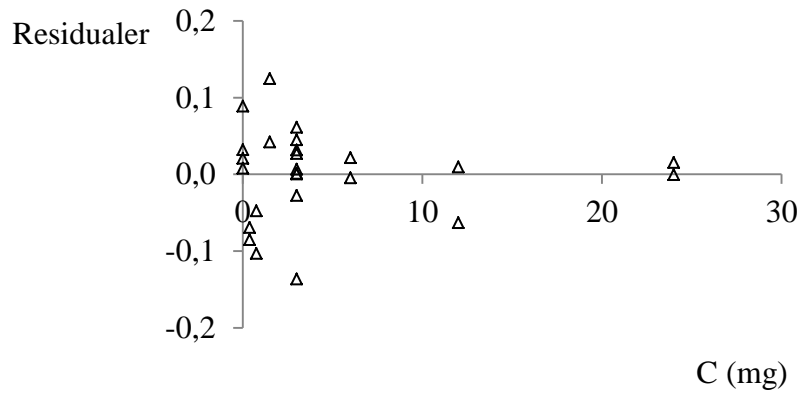
## BILAGA 1

Tabell VII Vik, dag 861, övriga resultat.

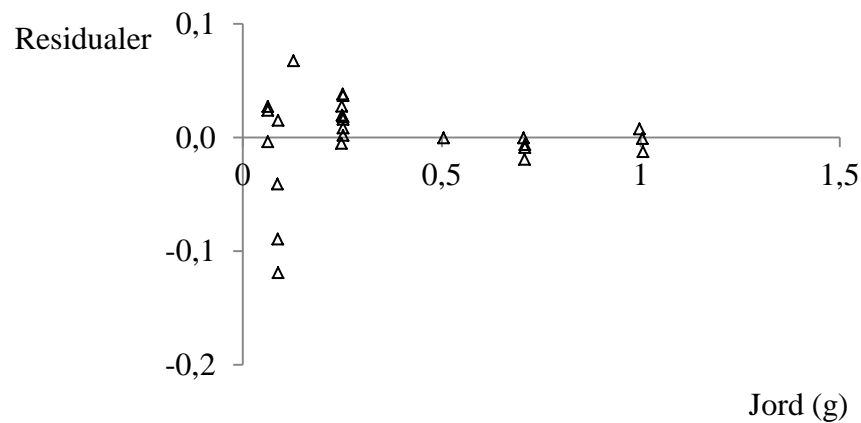
	Jord g	C mg	Färg	Potentiometri	Kolorimetri	Jonkromatografi
				pH	H <sub>2</sub> S mg/l	SO <sub>4</sub> mg/l
1	0,06	0,75	Brun	7,80	0,0	320
2	0,09	0,375	Brun	8,12	0,0	310
3	0,09	3	Svart	8,10	7,5	260
4	0,13	1,5	Svartgrå	8,12	0,0	280
5	0,25	0,75	Mörkbrun	8,05	0,0	310
6	0,25	1,5	Svart	8,02	0,2	260
7	0,25	3	Mycket svart	8,21	3,0	230
8	0,25	3	Mycket svart	8,10	2,3	230
9	0,25	3	Mycket svart	8,31	5,5	230
10	0,25	3	Mycket svart	8,34	14,0	190
11	0,25	3	Mycket svart	8,26	6,9	220
12	0,25	6	Mycket svart	8,30	24,0	130
13	0,25	12	Mycket svart	8,12	50,0	10
14	0,50	6	Mycket svart	8,48	35,0	56
15	0,71	3	Mycket svart	8,11	0,0	220
16	0,71	24	Mycket svart	8,24	19,0	19
17	1,00	12	Mycket svart	8,15	0,1	6
18	0,09	0,375	Brun	7,93	0,0	310
19	0,09	3	Mycket svart	8,13	15,0	240
20	0,71	3	Mycket svart	7,99	0,0	200
21	0,71	24	Mycket svart	8,39	21,0	20
22	0,09	0,375	Brun	8,12	0,0	300
23	0,09	3	Mycket svart	8,23	16,0	230
24	0,71	3	Svart	7,90	0,0	210
25	0,71	24	Mycket svart	8,19	0,0	28
26	0,06	0	Brun	7,58	0,0	320
27	0,06	0	Brun	7,70	0,0	320
28	1,00	0	Brunlerig	7,44	0,0	310
29	1,00	0	Brunlerig	7,34	0,0	320
Kontroll	0	0		7,93	0,0	320



Figur I Håkansböle dag 141, residualerna som funktion av jorden. Regressionsmodell  $P = 0,19 - 0,19 \cdot J + 0,28 \cdot (1 - e^{-0,5 \cdot C})$ .

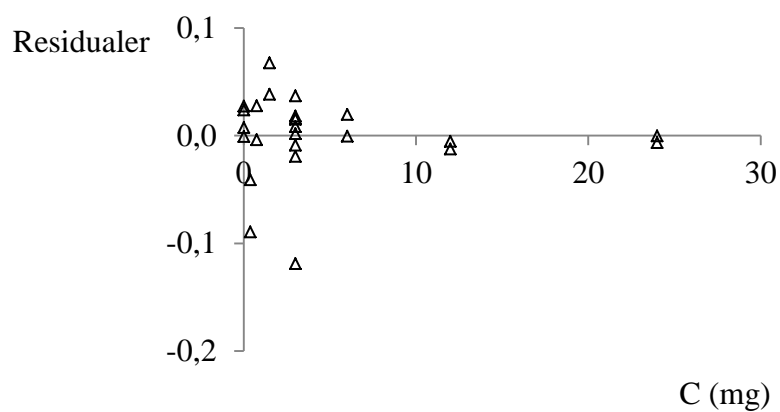


Figur II Håkansböle dag 141, residualerna som funktion av C. Regressionsmodell  $P = 0,19 - 0,19 \cdot J + 0,28 \cdot (1 - e^{-0,5 \cdot C})$ .

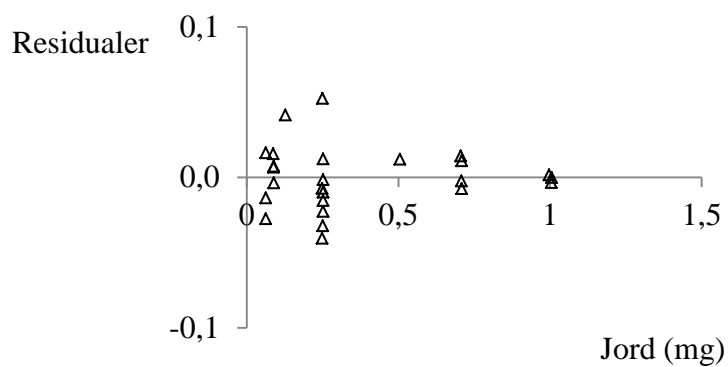


Figur III Håkansböle dag 196, residualerna som funktion av jorden. Regressionsmodell  $P = 0,12 - 0,10 \cdot J + 0,28 \cdot (1 - e^{-1,1 \cdot C/x})$ .

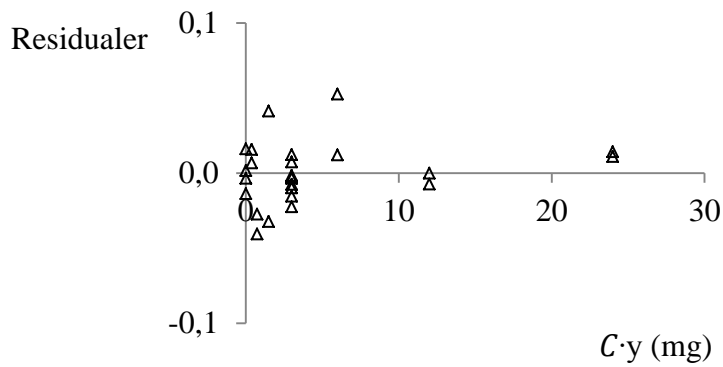
## BILAGA 2



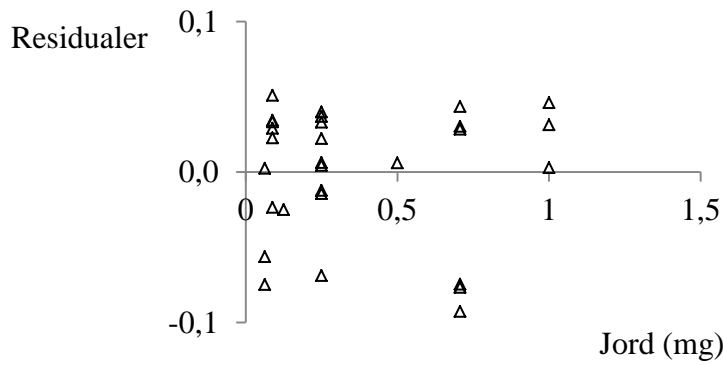
Figur IV Håkansböle dag 196, residualerna som funktion av C. Regressionsmodell  $P = 0,12 - 0,10 \cdot J + 0,28 \cdot (1 - e^{-1,1 \cdot C/x})$ .



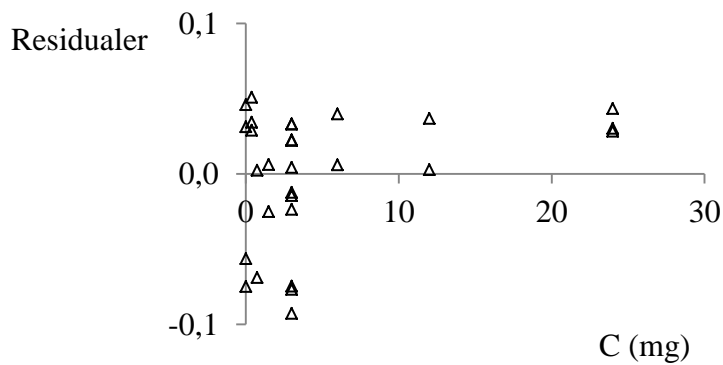
Figur V Håkansböle dag 308, residualerna som funktion av jorden. Regressionsmodell  $P = 0,22 \cdot e^{-1,4 \cdot J} + 0,25 \cdot (1 - e^{-4,8 \cdot C \cdot y})$ .



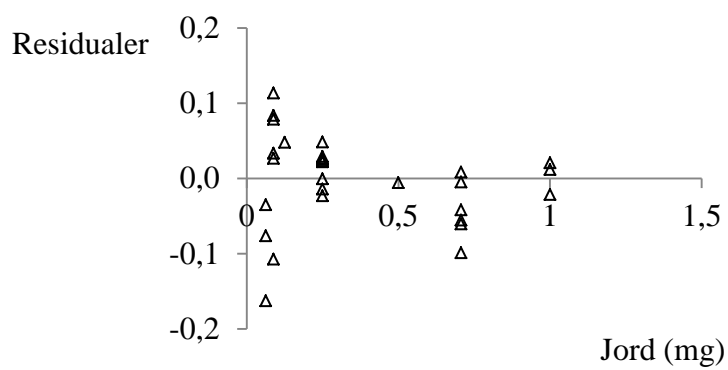
Figur VI Håkansböle dag 308, residualerna som funktion av C. Regressionsmodell  
 $P = 0,22 \cdot e^{-1,4 \cdot J} + 0,25 \cdot (1 - e^{-4,8 \cdot C \cdot y})$ .



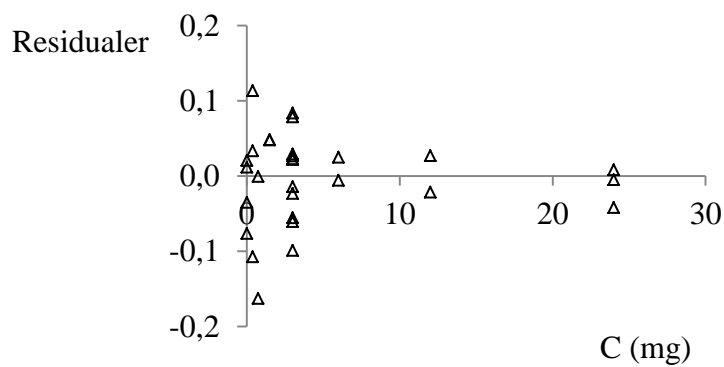
Figur VII Vik dag 738, residualerna som funktion av jorden. Regressionsmodell  
 $P = 0,27 \cdot e^{-3,2 \cdot J} + 0,33 \cdot (1 - e^{-1,5 \cdot C})$ .



Figur VIII Vik dag 738, residualerna som funktion av C. Regressionsmodell  
 $P = 0,27 \cdot e^{-3,2 \cdot J} + 0,33 \cdot (1 - e^{-1,5 \cdot C})$ .



Figur IX Vik dag 861, residualerna som funktion av jorden. Regressionsmodell  
 $P = 0,34 \cdot e^{-2,1 \cdot J} + 0,35 \cdot (1 - e^{-0,6 \cdot C})$ .



Figur X Vik dag 861, residualerna som funktion av jorden. Regressionsmodell  
 $P = 0,34 \cdot e^{-2,1 \cdot J} + 0,35 \cdot (1 - e^{-0,6 \cdot C})$ .